



**UNIVERSITÀ DI PISA**

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale  
Direttore Prof. Mario Petrini

Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica  
Direttore Prof. Paolo Miccoli

Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e  
Chirurgia  
Prof. Giulio Guido

## **CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN PSICOLOGIA CLINICA E DELLA SALUTE**

**“L'EPIGENETICA E LA TEORIA DELLE ORIGINI  
EMBRIOFETALI DELLE MALATTIE DELL'ADULTO (DOHaD)”**

**Relatore:**

Prof.ssa Lucia Migliore

**Candidata:**

Alessia Giovannelli

**Anno Accademico 2014/2015**

*A Giulia e Ginevra*

*per l'amore e la pazienza  
con cui mi state sempre vicino*

*A Didi*

*per l'uomo meraviglioso che sei*

## **RIASSUNTO**

La scoperta dei meccanismi epigenetici ha permesso il superamento del modello riduzionista in medicina, aprendo la possibilità ad un approccio sistemico che vede l'individuo e il suo stato di salute o malattia sotto l'influenza sia dell'ambiente che della dimensione biologica.

Le basi di questa visione della malattia furono poste negli anni '90 da D. J. Barker, epidemiologo britannico che elaborò la teoria sulle origini embrio-fetali delle malattie dell'adulto. Questa ipotesi ha avuto negli ultimi trent'anni molteplici riscontri epidemiologici, inizialmente per quanto riguarda le malattie cardiovascolari, il diabete e la sindrome metabolica, più recentemente anche per quanto riguarda i disturbi del neurosviluppo, quali schizofrenia, disturbi dello spettro autistico, ADHD, ansia e depressione.

L'epigenetica sta fornendo i possibili meccanismi molecolari in grado di dare una spiegazione causale a queste evidenze, aprendo la strada alla possibilità di rintracciare nelle “impostazioni iniziali della vita” le radici di disordini che si manifestano nella vita adulta, alla possibilità di diagnosi precoce su modificazioni cellulari epigenetiche e alla possibilità di attuare interventi di correzione e prevenzione delle modificazioni stesse, sia tramite farmaci, sia tramite il comportamento, quali alimentazione, attività fisica, gestione dello stress, ecc.

**PAROLE CHIAVE:** Epigenetica, DOHaD, Disturbi del neurosviluppo

## INDICE

<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
 <b>DA LAMARCK ALLA NASCITA DELL'EPIGENETICA.....</b>	<b>2</b>
<i>Lamarck e Darwin: le prime teorie sull'evoluzione.....</i>	<i>2</i>
<i>La nascita della genetica e il Neo-Darwinismo.....</i>	<i>2</i>
<i>Il paradigma riduzionista e il "dogma centrale della biologia molecolare".....</i>	<i>3</i>
<i>Il fallimento del "Progetto Genoma" e la rivoluzione epigenetica.....</i>	<i>5</i>
 <b>I MECCANISMI EPIGENETICI.....</b>	<b>9</b>
<i>Il crollo del dogma "un gene-una proteina".....</i>	<i>9</i>
<i>La scoperta dei primi fenomeni epigenetici.....</i>	<i>11</i>
<i>La metilazione del DNA.....</i>	<i>13</i>
<i>La modificazioni degli istoni.....</i>	<i>15</i>
<i>Gli RNA non codificanti.....</i>	<i>16</i>
 <b>EPIGENETICA NELLE PRIME FASI DELLA VITA.....</b>	<b>19</b>
<i>Imprinting genomico.....</i>	<i>19</i>
<i>Silenziamento del cromosoma X.....</i>	<i>23</i>
<i>Il ruolo dello stress nelle prime fasi della vita.....</i>	<i>25</i>
 <b>LA TEORIA DELLE ORIGINI EMBRIOFETALI DELLE MALATTIE DELL'ADULTO (DOHaD).....</b>	<b>29</b>
<i>La teoria delle origini embrio-fetali delle malattie dell'adulto (D. Barker).....</i>	<i>29</i>
<i>Le critiche alla teoria di Barker.....</i>	<i>35</i>

<b>EPIGENETICA NELLA VITA ADULTA.....</b>	<b>40</b>
<i>Il ruolo dell'alimentazione.....</i>	<i>41</i>
<i>Il ruolo dell'attività fisica.....</i>	<i>44</i>
<i>Il ruolo dello stress nella vita adulta.....</i>	<i>44</i>
<i>Il ruolo degli “Interferenti Endocrini” (IE).....</i>	<i>46</i>
 <b>EREDITARIETA' EPIGENETICA TRANSGENERAZIONALE.....</b>	 <b>50</b>
<i>I meccanismi dell'ereditarietà epigenetica transgenerazionale.....</i>	<i>50</i>
<i>Gli studi sugli animali.....</i>	<i>52</i>
<i>Gli studi sull'uomo.....</i>	<i>55</i>
 <b>LA PROGRAMMAZIONE EPIGENETICA EMBRIOFETALE DELLE MALATTIE COMPLESSE.....</b>	 <b>59</b>
<i>Malattie organiche.....</i>	<i>59</i>
<i>Aterosclerosi.....</i>	<i>59</i>
<i>Sindrome metabolica, Diabete e Malattie cardiovascolari.....</i>	<i>60</i>
<i>Malattie neurodegenerative.....</i>	<i>62</i>
<i>Alzheimer.....</i>	<i>62</i>
<i>Disturbi del neurosviluppo.....</i>	<i>63</i>
<i>Schizofrenia.....</i>	<i>63</i>
<i>Disturbi dello spettro autistico (ASD).....</i>	<i>67</i>
<i>Sindrome da deficit di attenzione e iperattività (ADHD).....</i>	<i>69</i>
<i>Disturbi d'ansia e dell'umore.....</i>	<i>71</i>
 <b>CONCLUSIONI.....</b>	 <b>74</b>
 <b>IL RUOLO DELLO PSICOLOGO.....</b>	 <b>79</b>

<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>I-XXXVII</b>
--------------------------	-----------------

## INTRODUZIONE

La fase scientifica che stiamo attraversando è caratterizzata, da un lato, dall'apertura verso nuove strade che portano ad una radicale rivoluzione nel nostro modo di concepire la vita, quali l'Epigenetica e la Psiconeuroendocrinoimmunologia (PNEI); dall'altro, da una forte resistenza al cambiamento da parte del modello medico corrente, che porta principalmente ad ignorare l'origine complessa delle malattie, facilitando così, ad esempio, il trattamento farmacologico e il fallimento della prevenzione.

Come scrisse Engel quasi quaranta anni fa, il modello medico dominante si fonda sul riduzionismo, sul dualismo mente-corpo e sull'attenzione al sintomo (Engel, 1977); con l'avvento dell'epigenetica il riduzionismo viene abbandonato e si apre la possibilità di vedere la cellula, il genoma e l'intero organismo attraverso un approccio sistemico, fornendo la base molecolare a molti fenomeni di modulazione dell'espressione genica. Ne deriva una visione complessa dell'individuo, caratterizzata dalla reciproca influenza della sua dimensione culturale e della sua dimensione biologica.

La malattia, in particolare, viene ad essere interpretata al di là dei limiti della tradizionale genetica di popolazione, in un contesto, cioè, che tenga conto anche della dinamica a breve termine del genoma, sia ontogenetica che transgenerazionale; esso, infatti, non è più visto come una rigida sequenza di basi, ma come uno dei molteplici moduli dinamici capaci anche di evoluzione a breve termine, persino nel corso di una sola vita.

Le basi di questa visione della malattia furono poste negli anni '90 da David Barker, il quale elaborò una teoria sulle origini embrionarie delle malattie dell'adulto (DOHaD: Developmental Origins of Health and Disease) (Barker et al., 1993; Barker, 1994).

Nel corso di questo lavoro vedremo che l'ipotesi di Barker ha avuto importanti e molteplici riscontri epidemiologici, ma soprattutto, nei vent'anni che l'hanno seguita, l'epigenetica è riuscita ad evidenziarne i possibili meccanismi molecolari in grado di darne una spiegazione causale.

## DA LAMARCK ALLA NASCITA DELL'EPIGENETICA

### *Lamarck e Darwin: le prime teorie sull'evoluzione*

E' del 1809 la pubblicazione dell'opera più famosa del naturalista francese Jean-Baptiste de Lamarck “ Philosophie zoologique”, nella quale per primo spiega una teoria sull'evoluzione degli organismi viventi; secondo Lamarck gli organismi sarebbero il risultato di un processo di graduale modificazione che avverrebbe sotto la pressione delle condizioni ambientali, in base a due leggi tra loro collegate:

- “Legge dell'uso e del non uso”, secondo la quale un organo si sviluppa quanto più è utilizzato e regredisce quanto meno è sollecitato.
- “Legge dell'ereditarietà dei caratteri acquisiti”, secondo la quale il carattere acquisito dall'organismo durante la sua vita viene trasmesso alla progenie.

In questo modo i vari adattamenti, accumulandosi e trasmettendosi attraverso le generazioni, avrebbero dato luogo a nuove specie, diverse da quelle originarie per effetto del costante adattamento all'ambiente (Lamarck, 1809).

Cinquanta anni dopo, nel 1859, fu pubblicata l'opera più famosa di Charles Darwin “L'origine delle specie”, nella quale l'autore espone la sua teoria dell'evoluzione, basata sul caso e sulla necessità; nelle varie specie, uomo compreso, si avrebbero delle mutazioni naturali casuali, che intervengono nel momento della riproduzione, e sarebbe poi l'ambiente a “salvare” quelle con caratteristiche adatte alla sopravvivenza e ad “eliminare” le altre; gli individui con il carattere adatto, più forti e più sani, quindi, potrebbero sopravvivere, riprodursi e trasmetterlo alla prole, garantendo l'evoluzione della specie per selezione naturale e per selezione sessuale (Darwin, 1859).

### *La nascita della genetica e il Neo-Darwinismo*

Il XX secolo iniziò con la riscoperta degli esperimenti di Gregor Mendel, pubblicati negli anni '60 dell'Ottocento, ma completamente ignorati fino a quando De Vries, Correns e von



Tschermak li ripresero nella rivista della Società Botanica Tedesca, fatto che contribuì alla nascita della Genetica nel 1906, e con le ricerche di August Weismann, che confermarono l'ipotesi darwiniana; questo condusse alla nascita del Neo-Darwinismo e al progressivo indebolimento del Lamarckismo, fino a configurarlo come una vera e propria eresia (Weismann, 1893).

Secondo il Neo-Darwinismo l'evoluzione è guidata dalla pressione selettiva su un preesistente assortimento di mutanti casuali; questo paradigma fu portato avanti e consolidato attraverso il lavoro dei “padri” della genetica sperimentale, da Russel Wallace, Fisher, Wright, fino a Morgan, Dobzhansky, Haldane, Hamilton, Darlington e Mayr, ma mancava di una conclusiva verifica sperimentale in laboratorio. Questa giunse nel 1943, quando Salvador Luria e Max Delbruck pubblicarono un articolo fondamentale per la storia delle scienze biologiche (Luria e Delbruck, 1943), dimostrando la casualità del processo mutazionale e quindi l'indipendenza tra mutazione e selezione, su una popolazione di microrganismi (colture batteriche differenziate di *Escherichia coli*) che, in virtù della loro rapida crescita, fornivano la necessaria numerosità statistica, e ponendo fine al Lamarckismo.

Il modello Neo-Darwiniano, però, non riusciva a spiegare processi evolutivi a breve termine, dell'ordine delle decine di anni ad esempio, in quanto un tale limite temporale avrebbe implicato necessariamente un meccanismo deterministico di generazione della variabilità, che ricondurrebbe all'idea Lamarckiana di carattere acquisito. In altri termini questo porterebbe ad escludere la casualità nell'insorgenza della mutazione e ad ammettere l'esistenza di un meccanismo molecolare “guidato” dalle condizioni ambientali, in netto contrasto con quanto osservato da Luria e Delbruck (Paganetto e Aiello, 2013).

### *Il paradigma riduzionista e il “dogma centrale della biologia molecolare”*

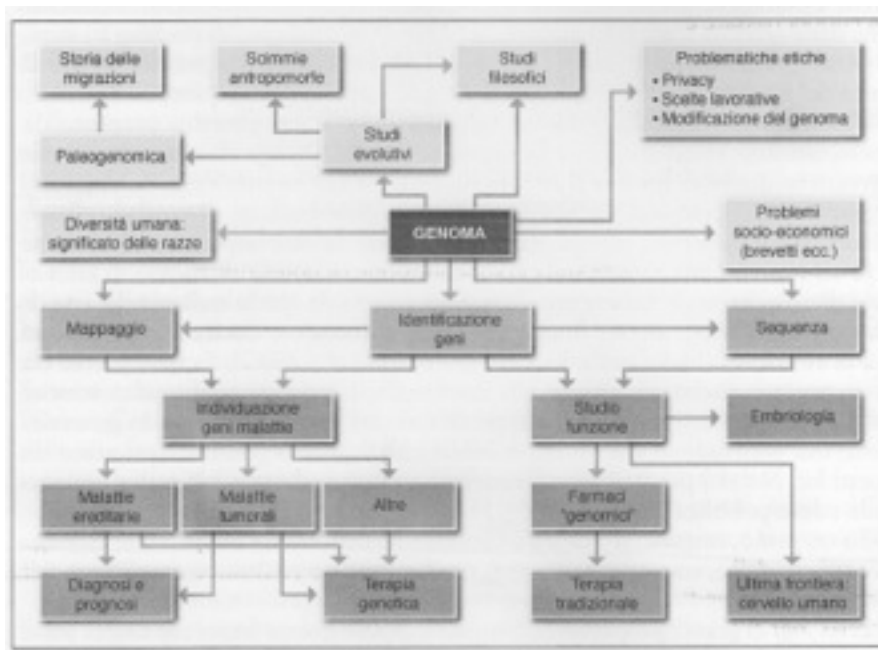
In quegli anni gli studi di genetica e di biologia molecolare avevano come prioritaria finalità la qualificazione temporale di insorgenza della mutazione e della sua fissazione nella popolazione, e si basavano sul modello riduzionista e meccanicista, che è stato il modello dominante in genetica per tutto il Novecento. Questo paradigma si basava sulla convinzione di poter ridurre a determinanti semplici e incontrovertibili la complessità della vita, la salute e

la malattia, ed ebbe la sua massima espressione negli anni Settanta e Ottanta in diversi campi (Engel, 1977): in biologia, dove si accompagna all'esplosione della biologia molecolare, che portò ai lavori sul modello della doppia elica del DNA, presentato nel 1953 da James Watson e Francis Crick (Watson e Crick, 1953), e al successivo “dogma centrale della biologia molecolare” (Crick, 1958; 1970); in psicologia, con la nascita del cognitivismo classico (Putnam, 1975) e delle psicoterapie ad orientamento cognitivista (Beck, 1976); nelle neuroscienze, con la teoria della mente modulare (Fodor, 1976), che dette impulso al progetto di riduzione e astrazione dei processi psichici e mentali; in farmacologia e in medicina, con la ricerca concentrata sulla scoperta di nuovi microrganismi, degli oncogeni e poi, verso la fine degli anni Ottanta, dei recettori cellulari tramite anticorpi monoclonali (An, 2009).

Secondo il “dogma centrale della biologia molecolare”, l'informazione genetica contenuta nel DNA viene accuratamente trascritta in RNA, la quale viene poi tradotta in una proteina, che sarà la base della struttura da cui emergerà la funzione dell'organismo; come corollario abbiamo il concetto che ad un gene corrisponde una sola proteina e che la direzione del processo è lineare: dal DNA all'RNA alla proteina e non viceversa (Crick, 1970).

Emerge da questo paradigma la chiara convinzione che ciò che conta è la sequenza delle basi del DNA, cioè la supremazia dei geni sul fenotipo, sul comportamento dell'essere vivente e sull'ambiente, dalla quale deriva la convinzione della casualità della variabilità genetica e quindi dell'evoluzione stessa della vita (Bottaccioli, 2014).

Questo portò, alla fine del secolo, a varare il progetto di sequenziamento di tutto il genoma umano (*Human Genome Project*), la cui conclusione fu annunciata dieci anni dopo, nel giugno del 2000, dal presidente statunitense Bill Clinton e dal Primo Ministro britannico Tony Blair. Questo evento sembrava aprire una nuova era: quella della conoscenza certa dei determinanti della salute e della malattia, nella ferma convinzione che lo studio dei geni fosse la chiave per capire tutto, in quanto il programma della vita di ogni individuo si trovava scritto nei suoi geni; questo avrebbe portato ad individuare i geni responsabili di tutte le malattie (cancro in primis), non solo di quelle ereditarie monogeniche, allo scopo di attuare una diagnosi precoce e una terapia genica mirata (Dulbecco e Vezzoni, 1998), come illustrato dallo schema in figura 1.



**Figura 1** Il modello riduzionista centrato sui geni. (“Dieci anni di Progetto Genoma”, *Le scienze Quaderni. Il Progetto Genoma*, a cura di Dulbecco R. Vezzoni P., 1998; 100: 3-12).

### *Il fallimento del “Progetto Genoma” e la rivoluzione epigenetica*

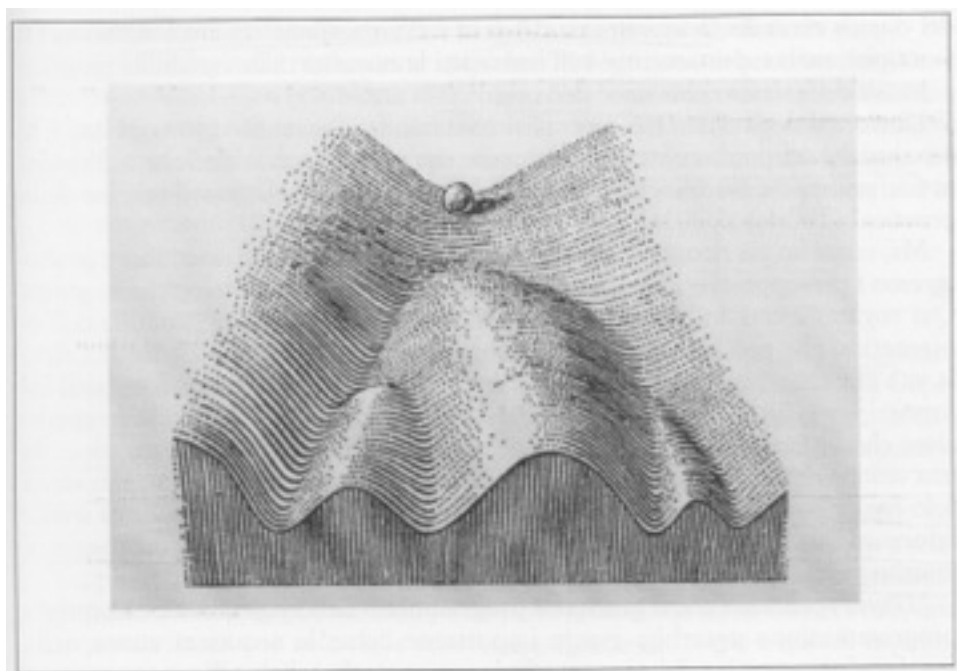
In realtà il Progetto Genoma ha fallito sia sul piano dell’incremento delle capacità predittive e diagnostiche, sia sul piano delle aspettative terapeutiche, e la ragione può essere ricercata certamente nel fatto che le aspettative erano esagerate e irrealistiche, ma anche nel fatto che è sbagliato il modello riduzionista che le sottende (Bottaccioli, 2014).

Negli anni di massima presa del paradigma riduzionista, tra il 1939 e il 1943, il biologo statunitense Conrad Waddington propose le sue ricerche, con le quali presentava la sua visione innovativa della biologia e della genetica (Waddington, 1939; 1942); partendo dallo studio dell’embriogenesi, la sua ricerca fu fin dall’inizio orientata all’individuazione di una connessione tra embriologia e genetica, in quanto Waddington era convinto che le dinamiche di formazione di un organismo, che portano dal genotipo al fenotipo, fossero più complesse delle informazioni contenute nei suoi geni. Attraverso i suoi esperimenti condotti su *Drosophila melanogaster*, introdusse il concetto di “canalizzazione” (Waddington, 1942); esponendo per 4 ore alla temperatura di 40°C pupe di *Drosophila* tra la diciassettesima e la ventitreesima ora dopo la formazione della pupa, ottenne in alcuni organismi l’anomala interruzione della venatura posteriore dell’ala, come avviene nel fenotipo *crossveinless* in

seguito a mutazione sul cromosoma I. Usando questi esemplari per produrre la seconda generazione e ripetendo sia il trattamento di shock termico sia la selezione, dopo quattordici generazioni ottenne organismi con il carattere *crossveinless* anche senza sottoporli a shock termico. L'incrocio successivo di questi esemplari portò ad un ceppo in cui erano presenti con frequenza elevata *crossveinless* spontanei. Waddington non interpretò questi risultati pensando che la mutazione negli organismi *crossveinless* fosse stata indotta dal trattamento termico, bensì ritenne che i ceppi studiati contenessero già le varianti genetiche capaci di indurre il carattere *crossveinless*, ma che queste rimanessero inesprese grazie ad un meccanismo molecolare capace di neutralizzarne l'espressione fenotipica. Egli definì questo processo "canalizzazione" ed ipotizzò che lo shock termico fosse in grado di compromettere la canalizzazione, consentendo alle alterazioni nascoste (*hidden variations*) di esprimersi a livello fenotipico; i trattamenti sulle generazioni successive esporrebbero poi il fenotipo anomalo al processo di selezione, permettendo la fissazione del carattere. Waddington introdusse quindi il concetto di "assimilazione genica", riavvicinandosi molto alla teoria Lamarckiana dei caratteri acquisiti, anche se attraverso un meccanismo diverso: il carattere viene acquisito non tramite trasmissione diretta come sosteneva Lamarck, ma mediante la selezione di individui adatti ad un ambiente, i quali trasferiscono il carattere ad una popolazione che però può vivere anche in un ambiente diverso, pur mantenendo la variazione (Waddington, 1979); quello che due individui trasmettono alla propria prole non è un insieme di caratteristiche già formate, ma un insieme di potenzialità, che entreranno in relazione con l'ambiente e daranno origine al nuovo fenotipo (Waddington, 1961).

Dunque secondo Waddington il fenotipo selvatico può contenere molteplici mutazioni nascoste, che si esprimeranno fenotipicamente solo in particolari condizioni, ovvero in seguito all'integrazione dinamica di vari determinanti biologici; queste considerazioni lo portarono alla definizione di "Paesaggio Epigenetico" (Waddington, 1957); come rappresentato dalla figura 2, una cellula primordiale totipotente durante il suo differenziamento si muove lungo un percorso come se fosse una sfera in movimento su una superficie costituita da promontori e avvallamenti; l'avanzamento lungo tale percorso determina perdita di potenzialità e acquisizione progressiva di specializzazione, fino al raggiungimento di una condizione di definita capacità espressiva; le interazioni genetiche

modellano il paesaggio epigenetico, ma lasciano, tuttavia, un ampio margine di potenzialità, grazie ai diversi percorsi alternativi possibili; l'espressione genica, quindi, può essere canalizzata in vari percorsi, in base al meccanismo di integrazione di una complessa rete di interazioni (Waddington, 1957).



**Figura 2** Paesaggi epigenetici. (Waddington CH., *The Strategy of the Genes*, Allen and Unwin, London 1957)

E' con Waddington, quindi, che si ha la prima definizione di "epigenetica", sebbene strettamente riferita all'ambito dell'embriologia, come quella disciplina finalizzata alla comprensione dei meccanismi che guidano lo sviluppo embrionale, dal genotipo al fenotipo, e di "epigenotipo", come l'insieme di quei processi per cui un disturbo in una fase precoce dello sviluppo può causare gradualmente, a distanza, anomalie in vari organi e tessuti (Waddington, 1942).

Nel 1958 David L. Nanney, genetista americano che si occupava principalmente dello studio dei ciliati, pubblicò un articolo che riprendeva esplicitamente le ricerche di Waddington e nel quale avanzò alcune idee fondamentali sui sistemi di controllo epigenetico a livello cellulare (Nanney, 1958). Nanney si pose il quesito di come potesse avvenire la differenziazione cellulare a partire da un unico genoma, ovvero, come fosse possibile la differenziazione morfofunzionale delle cellule (neuroni, cellule epatiche, cellule epiteliali, ecc.) se nel loro nucleo era contenuto lo stesso patrimonio genetico e si chiese anche come si

mantenesse questa differenziazione cellulare. Egli sostenne che nelle cellule, accanto al sistema genetico, operasse anche un sistema epigenetico responsabile del differenziamento e della stabilità della configurazione cellulare, e capace anche di dare alle cellule una memoria che poteva essere trasmessa alle cellule figlie. Ne consegue che cellule con lo stesso genotipo non solo possono portare a fenotipi differenti, ma queste differenze, nello stesso ambiente, possono persistere indefinitamente durante la divisione cellulare; ipotizzò, inoltre, che i sistemi di controllo epigenetico fossero presenti nel nucleo, a livello dei cromosomi, e non nel citoplasma (Nanney, 1958).

Questa dimensione cellulare della ricerca epigenetica venne ripresa pochi anni dopo dall'italiano Salvatore Luria, che nel 1960 dette la prima definizione di epigenetica in chiave di biologia cellulare:

“Una importantissima distinzione va fatta tra meccanismi di modificazione cellulare genetici ed epigenetici. Una modificazione è definita genetica (o *nucleica*) se altera il materiale genetico della cellula, cioè la struttura, le dimensioni o il numero delle macromolecole del codice - gli acidi nucleici - che contengono grosse quantità di informazioni dettagliate. Le modificazioni epigenetiche (o *epinucleiche*) invece sono cambiamenti nell'espressione delle potenzialità genetiche, come attivazione, inibizione o interazioni competitive, che possono intervenire a livello dell'azione primaria svolta dai geni o a livello del metabolismo cellulare” (Luria, 1960, p. 679).

Con questa affermazione Luria confermò l'idea di Nanney che la sede dei meccanismi epigenetici fossero i cromosomi contenuti nel nucleo delle cellule, ed aprì la strada a trent'anni di ricerche mirate a smentire i presupposti e le conclusioni del dogma centrale e a fare dell'epigenetica la nuova scienza della genetica (Tollefsbol, 2011).

## I MECCANISMI EPIGENETICI

### *Il crollo del dogma “un gene-una proteina”*

Secondo il dogma centrale della biologia molecolare, come introdotto nel capitolo precedente, ogni gene codifica per una proteina, seguendo una logica programmata, e il trasferimento delle informazioni segue una direzionalità precisa, ovvero, dal DNA all'RNA messaggero, che le traduce poi in una proteina (Crick, 1970); ne consegue che la vita viene ad essere considerata un assemblaggio di molecole prodotte punto per punto, senza alcuna possibilità di retroagire sulle condizioni che l'hanno prodotta.

Già pochi anni dopo la prima enunciazione del dogma centrale, però, Francois Jacob e Jacques Monod presentarono un modello di regolazione dell'attività genica, definito “*operone*”, che presupponeva l'esistenza di una proteina funzionante da interruttore del DNA (Jacob e Monod, 1961); questo lavoro documentava quindi, per la prima volta, un'interazione proteina-DNA, anche se Monod stesso negò poi tale evidenza, dichiarando inconcepibile qualunque meccanismo in grado di trasmettere al DNA una qualsiasi istruzione o informazione, e definendo il DNA come “invariante fondamentale” (Monod, 1970).

Gli studi che portarono alla definizione dell'organizzazione del genoma umano e alla comprensione del suo funzionamento fecero, però, crollare definitivamente il dogma di Crick e anche quello di Monod.

Il genoma umano è organizzato in 44 autosomi e 2 cromosomi sessuali, XX nella femmina e XY nel maschio; sono situati nel nucleo della cellula e sono strutture di varia grandezza che compattano insieme DNA e proteine, istoniche e non istoniche, dando origine alla cromatina. La cellula dispone anche di altre informazioni genetiche contenute all'esterno del nucleo, nel DNA dei mitocondri, che sono piccoli organuli citoplasmatici con un proprio DNA circolare e che svolgono funzioni metaboliche fondamentali. Mentre i cromosomi sono forniti alla cellula figlia in parti uguali dai due genitori, i mitocondri sono esclusivamente di origine materna.

Il DNA, acido desossiribonucleico, è costituito da due filamenti che si accoppiano a formare, secondo il modello di Watson e Crick, una doppia elica in senso destrorso (senso orario) e antiparallelo (la testa di un filamento si lega con la coda dell'altro); ciascun filamento è costituito da unità elementari chiamate nucleotidi, composti da uno zucchero (desossiribosio), da un gruppo fosfato e da una delle seguenti basi: Adenina, Timina, Guanina e Citosina; le basi si appaiano a due a due (Adenina-Timina; Guanina-Citosina) attraverso legami fosforici deboli e si trovano all'interno della doppia elica, mentre lo zucchero e il fosfato ne costituiscono l'impalcatura esterna, con legami fosfodiesterici forti. Le proteine svolgono un ruolo fondamentale, in quanto danno l'assetto al cromosoma e al DNA; in particolare le proteine istoniche, piccole proteine basiche ricche di arginina e di lisina, sono responsabili dell'impacchettamento del lunghissimo filamento di DNA (circa due metri) in pochi micron di diametro, in quanto si raggruppano a formare un nucleo, attorno al quale si avvolge il filamento di DNA; questa unità di base si chiama nucleosoma. Il collegamento tra i vari nucleosomi è garantito da un DNA linker e dalla proteina istonica H1; dai nucleosomi escono delle code istoniche, che sono sede di importanti processi epigenetici. E' importante notare che il grado di impacchettamento della cromatina è variabile nel cromosoma e questo è un aspetto fondamentale in quanto regola l'attività genica: meno compatta è la cromatina e più attiva è quell'area e viceversa; in particolare si definisce "eucromatina" l'area del cromosoma che è attiva, ed "eterocromatina" l'area che è meno o non attiva (Russell, 2007; Alberts, 2008).

Gli studi sul funzionamento del DNA hanno messo in luce che esso di per sé è una molecola inerte, non autocatalitica come riteneva Monod, quindi per esprimersi necessita di un'attivazione; il DNA deve srotolarsi per permettere l'accesso ad un complesso di attivazione, composto da fattori di trascrizione e da un enzima, la RNA polimerasi; su uno dei due filamenti viene a stamparsi un pre-RNA (acido ribonucleico, che differisce dal DNA in quanto lo zucchero è il ribosio e la base che si lega all'Adenina è l'Uracile), detto "trascritto primario", che trascrive la sequenza, costituita sia da aree codificanti, gli esoni, che non codificanti, gli introni; a questo punto vengono eliminati gli introni e uniti tra loro gli esoni grazie ad un processo di "*splicing*", che porta ad ottenere un RNA maturo, pronto per montare gli amminoacidi nella catena polipeptidica, la quale darà poi origine alla proteina



ripiegandosi in una conformazione tridimensionale. Da diversi anni è stato accertato che il processo di splicing può avvenire in più direzioni grazie ai processi di “*splicing alternativo*”, in base ai quali possono essere selezionati gli esoni, o addirittura porzioni di essi, che andranno a costituire l’RNA messaggero; ne consegue che, a partire dalla stessa sequenza di DNA, si possono ottenere diversi RNA messaggero a seconda del tipo di splicing che si realizza (Cech, 1982; Altman, 1982). Inoltre è stata dimostrata la comunicazione tra proteine grazie alla scoperta dei “*prioni*”, proteine che assumono una diversa conformazione in base al contatto con altre proteine (Prusiner, 1982; Linden et al., 2008), ed è stato dimostrato anche che le proteine sono una fonte essenziale di comunicazione con il DNA, oltre ad essere i segnali (fattori di trascrizione, enzimi) che lo attivano. Infine è stata dimostrata anche la retroazione dell’RNA sul DNA, sia attraverso la *trascrittasi inversa*, processo usato dai virus per stampare DNA a partire dall’RNA (Baltimore, 1970; Temin e Mizutani, 1970), sia attraverso i microRNA, che impediscono l’attività di altri RNA e che quindi non consentono al DNA di trasmettere le proprie informazioni (Napoli et al., 1990; Van der Krol et al., 1990).

Queste acquisizioni, dunque, hanno demolito il dogma centrale della biologia molecolare, ed hanno aperto la strada alla comprensione dei processi di regolazione epigenetica.

### *La scoperta dei primi fenomeni epigenetici*

Paradossalmente, alcuni tra i più rilevanti fenomeni epigenetici furono scoperti proprio tra gli anni ’50 e gli anni ’60 (Lewis, 1954; Brink, 1954; Lyon, 1961), ovvero negli stessi anni in cui fu scoperta la mutazione come alterazione del codice genetico (Watson e Crick, 1953), e questo ha comportato un forte rallentamento nella loro considerazione, in quanto ogni sforzo interpretativo dei risultati veniva ricondotto al concetto di alterazione della sequenza nucleotidica.

Già nel 1954 Lewis descrisse il fenomeno della “*transversione*” in *Drosophila*, ovvero il condizionamento reciproco tra due alleli sui due cromosomi omologhi, che richiede una forma di appaiamento e può portare sia all’attivazione che alla repressione genica (Lewis, 1954); questo fenomeno è stato osservato più recentemente in molte altre specie, tra cui l’uomo, anche se in condizioni patologiche (Hui et al., 2008), ed è da considerarsi

“epigenetico” in quanto si può verificare anche in regioni non trascritte del genoma (McKee, 2004).

Nello stesso anno Brink, studiando la trasmissione del carattere colore rosso nei semi di mais (*Zea mays*), scoprì il fenomeno della “*paramutazione*”, ovvero uno dei due alleli induce un’espressione anomala nell’altro allele, in assenza di alterazioni della sequenza nucleotidica (Brink, 1954); questa osservazione è stata poi estesa ad altri organismi vegetali, come il pisello (*Pisum sativum*) e il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) (Hollick et al., 1997), e successivamente anche al topo (Rassoulzadegan et al., 2006).

Nel 1961 Lyon osservò il più noto tra i fenomeni epigenetici, la “*inattivazione del cromosoma X*”, studiando i caratteri sessuali nei mammiferi (Lyon, 1961); per compensare il diverso dosaggio genico nelle femmine, che hanno due cromosomi X, rispetto ai maschi, che ne hanno uno solo, si ha la disattivazione di uno dei due cromosomi X nella femmina, generando una struttura condensata detta “*corpo di Barr*”. Questa inattivazione è un processo epigenetico, in quanto non è riconducibile ad alcuna alterazione della sequenza genomica, è permanente e trasmissibile alle generazioni successive; l’inattivazione avviene nell’embrione pre-impianto e il cromosoma X inattivato può essere sia di origine materna che paterna in maniera casuale; questo rende le femmine di mammifero un mosaico (Van den Berg, 2009).

Altri importanti contributi alla scoperta dei fenomeni epigenetici sono quelli che hanno dimostrato un disaccoppiamento tra varianti fenotipiche e genetiche, ovvero che organismi geneticamente identici possono differire sensibilmente a livello fenotipico e funzionale. Ne è un esempio l’orientamento della larva durante lo sviluppo ad ape regina o ad ape operaia, che è condizionato unicamente dal tipo di alimentazione, in quanto questa è in grado di orientare l’espressione di geni specifici (Kucharski et al., 2008). Un altro esempio è fornito dalle “*proteine da stress*”: quando una cellula è sottoposta ad uno stress ambientale riduce sensibilmente o arresta completamente alcune sue funzioni vitali fondamentali, come la sintesi delle proteine o degli acidi nucleici, o i processi di trasporto; le proteine da stress costituiscono un’eccezione, in quanto la loro sintesi viene incrementata. Queste proteine sono molto importanti per il mantenimento dell’omeostasi cellulare e sono coinvolte nella difesa della cellula da stress durante le infezioni e l’invecchiamento, e sono state identificate grazie a studi condotti su *Drosophila melanogaster*, sottoponendo le larve a shock termico; da qui la

loro definizione “*Heat shock proteins*” (*Hps*) (Ritossa, 1962). La maggior parte di esse sono *Chaperonine*, ovvero proteine che, legandosi ad altre proteine, le stabilizzano consentendone la corretta funzionalità biologica (Hartl, 1996); infatti sono in grado di ricondurre una proteina alla sua corretta struttura funzionale nonostante la presenza di mutazioni, ovvero sono in grado di vanificare la cascata di alterazioni strutturali, e quindi funzionali, che consegue alla variazione della sequenza nucleotidica. Inoltre è stato dimostrato che la perdita di funzionalità delle proteine da stress, quando non induce embrioletalità, provoca la comparsa di variazioni fenotipiche a carico di molte strutture dell’organismo adulto, sia in *Drosophila* (Rutherford e Lindquist, 1998), sia in *Arabidopsis thaliana* (Queitsch et al., 2002). Queste scoperte hanno permesso di associare i concetti di *canalizzazione genetica* e di *hidden variations*, introdotti da Waddington, ad uno specifico meccanismo molecolare; quando la funzionalità delle proteine da stress è compromessa, le *hidden variations* sono espresse in un nuovo fenotipo, manifestandosi, quindi, come nuove mutazioni.

### *La metilazione del DNA*

Il primo evento che ha aperto la strada alla comprensione dei processi di regolazione epigenetica è stato la scoperta della metilazione del DNA, meccanismo estremamente rilevante nel controllo coordinato e funzionale dell’espressione genica.

Nei mammiferi la metilazione, ovvero l’aggiunta di un metile ( $\text{CH}_3$ ), avviene quasi esclusivamente sul carbonio in posizione 5 della Citosina, trasformandola in 5-metilcitosina, all’interno dei dinucleotidi CpG (dove “p” indica il gruppo fosfato che lega la Citosina alla Guanina); i CpG sono abbastanza dispersi nel genoma e circa il 70% di essi è metilato, ma sono state individuate delle aree in cui la loro concentrazione arriva ad essere il 20% in più del normale (“isole CpG”); queste aree sono vicine ai siti dove inizia la trascrizione, o anche all’interno del gene, e normalmente non sono metilate; questo ci suggerisce che la funzione normale della metilazione è quella di silenziare, cioè di non far esprimere il gene. E’ stato osservato, però, che, se la metilazione avviene nell’area del cosiddetto promotore (area della sequenza nucleotidica che attiva il DNA in seguito alla ricezione di un segnale da parte di un fattore di trascrizione), l’effetto è proprio quello di repressione dell’espressione genica,

altrimenti, se la metilazione avviene a livello delle isole che si trovano all'interno del gene, l'effetto è quello di stimolazione della trascrizione del DNA e il gene viene indotto ad esprimersi (Suzuki e Bird, 2008).

Quindi la metilazione può avere effetti opposti a seconda di dove sono collocate le citosine metilate.

Esistono vari enzimi deputati alla metilazione del DNA; questi possono essere raggruppati in due classi principali:

- “*de novo* DNA metiltransferasi”, che metilano le citosine su entrambe le catene del DNA, usando come donatore di metili la S-Adenosil-L-metionina, e che intervengono quando viene silenziato un gene o anche un intero cromosoma.
- “DNA metiltransferasi di mantenimento”, che metilano una sola catena di DNA contrapposta all'altra catena metilata, e che intervengono durante la replicazione per mantenere la marcatura della cellula madre nelle cellule figlie.

La presenza della 5-metilcitosina nel DNA era stata riportata per la prima volta nel 1925 nel *Mycobacterium tuberculosis* (Johnson e Coghill, 1925); successivamente era stata ipotizzata su acidi nucleici idrolizzati in base ad evidenze spettroscopiche e cromatografiche (Hotchkiss, 1948), ma fu confermata nel dettaglio solo negli anni '50 (Wyatt, 1950; 1951a; 1951b). Solo vent'anni dopo, grazie ai lavori di Riggs, Holliday e Pugh, si è riusciti a stabilire un'associazione tra metilazione del DNA e controllo genetico (Riggs, 1975; Holliday e Pugh, 1975). Nei primi anni '80 furono purificate, clonate e caratterizzate le diverse tipologie di metiltransferasi (Bestor e Ingram, 1983; Lei et al., 1996), finché, dagli anni '90 in poi, ha iniziato a delinearsi il complesso meccanismo di controllo del differenziamento embrionale tramite i processi di metilazione e demetilazione del DNA (Bestor et al., 1988; Li E. et al., 1992; Li C. et al., 2009). Oggi gli studi si concentrano soprattutto sul meccanismo della demetilazione del DNA, in quanto non ne sono ancora stati chiariti i dettagli; sembra che sia un processo attivo e costante, importante per garantire la necessaria flessibilità alla marcatura epigenetica (Grange e Lourenço, 2011), soprattutto in organi altamente responsivi come il cervello (Guo, 2013).

## *La modificazione degli istoni*

Attraverso una serie di modificazioni dei residui di lisina e di arginina nelle code istoniche, viene indotto il rilassamento o la compattazione della cromatina, facilitando o sopprimendo la trascrizione. Attualmente i principali tipi di modificazioni istoniche identificati sono:

- *Acetilazione*: si realizza con il trasferimento di un gruppo acetile (COOH) da una molecola di Acetil-Coenzima A sui residui di lisina della coda istonica, tramite l'enzima Istone-acetiltransferasi (HAT); l'acetilazione attiva la trascrizione genica e lavora in rapporto con la demetilazione (Szyf et al., 2008).
- *Deacetilazione*: consiste nella rimozione di un gruppo acetile tramite una serie di enzimi chiamati Istone-deacetilasi (HDAC); questi sono circa dodici raggruppati in tre classi e la loro attività porta al blocco dell'espressione genica; per questo la deacetilazione è strettamente combinata con la metilazione del DNA, che ha, infatti, lo stesso effetto (Tollefsbol, 2011).
- *Metilazione*: consiste nel trasferimento di un gruppo metilico (CH<sub>3</sub>), che può avvenire sia sui residui di lisina, grazie agli enzimi Lisina-metiltransferasi (KMT), sia sui residui di arginina, grazie agli enzimi Istone-metiltransferasi (HMT); inoltre la metilazione può raddoppiare o triplicare, rendendo la coda istonica mono-, bi- o tri-metilata; questo comporta che la metilazione delle code istoniche possa avere effetti diversi sulla trascrizione genica, in senso attivante o inibente (Ng et al., 2009).
- *Demetilazione*: consiste nella rimozione di un gruppo metilico, portando conseguentemente ad effetti opposti alla metilazione; come descritto precedentemente, la demetilazione delle code istoniche è il meccanismo meno conosciuto, ancora oggetto di numerosi studi.
- *Fosforilazione*: si realizza attraverso il trasferimento di un gruppo fosfato (PO<sub>4</sub>) tramite gli enzimi della famiglia delle chinasi, sui residui di serina, treonina e tirosina della coda istonica; la fosforilazione porta all'attivazione della trascrizione genica (Tollefsbol, 2011).
- *Defosforilazione*: consiste nella rimozione di un gruppo fosfato grazie all'enzima fosfatasi e il suo effetto è quello di inibizione della trascrizione (Tollefsbol, 2011).

- *Ubiquitinazione*: consiste nel deposito nelle code istoniche della proteina ubiquitina, composta da 76 amminoacidi, e così chiamata in quanto diffusa in tutti i tessuti, dove svolge la funzione di segnale di degradazione, stimolando i macrofagi e altre cellule immunitarie alla pulizia tissutale. E' stato osservato che l'addizione di piccole molecole simili all'ubiquitina (*Small Ubiquitin-Like Modifier*) porta alla repressione dell'espressione genica (Shiio e Eisenman, 2003).
- *Isomerizzazione della prolina*: consiste nel cambiamento di forma delle proteine istoniche tramite enzimi prolina-isomerasi (Tollefsbol, 2011).

E' importante sottolineare che questi meccanismi non agiscono indipendentemente l'uno dall'altro, ma in sequenza, secondo un ordine prestabilito, ovvero secondo un "codice istonico", chiamato da Turner "codice epigenetico" (Turner, 2000); è stato dimostrato, ad esempio, che la monoubiquitinazione della Lisina 120 sull'istone H<sub>2</sub>B stimola la metilazione della Lisina 4 sull'istone H<sub>3</sub>, che, a sua volta, determina l'attivazione trascrizionale (Dover et al., 2002; Kim et al., 2009).

### *Gli RNA non codificanti*

Si tratta di RNA che, a differenza dell'RNA messaggero (mRNA), non hanno la funzione di tradurre l'informazione genica in proteine, bensì quella di modulare l'espressione genica. Questo terzo meccanismo di controllo epigenetico fu ipotizzato per la prima volta in due articoli pubblicati nel 1990 (Napoli et al., 1990; Van der Krol et al., 1990); gli autori stavano cercando di sovra-esprimere il gene dell'enzima diidroflavonol-4-reduttasi, responsabile dell'intensa colorazione blu in petunia; contrariamente alle attese, in seguito all'introduzione del gene, la pigmentazione si ridusse del 42% nelle piante trattate, suggerendo l'ipotesi che l'espressione del transgene e del gene endogeno venissero sopresse in modo coordinato (co-soppressione).

Studi successivi confermarono l'ipotesi ed evidenziarono che tale fenomeno era ampiamente diffuso, indirizzando verso ricerche di RNA associati alla co-soppressione; così fu scoperto il "silenzamento post-trascrizionale", che avviene attraverso la sintesi di RNA non codificanti di vario tipo (ncRNA), quali micro-RNA (miRNA) di poche decine di

nucleotidi e piccoli RNA interferenti detti smRNA (*small interfering*); inoltre vennero caratterizzati altri ncRNA che, in base al meccanismo interferenziale e alle caratteristiche strutturali, vennero denominati dsRNA (*double strand RNA*) (Fire, 1998), stRNA (*small temporal RNA*) (Reinhart et al., 2000), siRNA (*short, small interfering RNA*) (Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2001b), ed altri. Recentemente sono stati scoperti anche RNA non codificanti a struttura più lunga, ovvero contenenti più di 200 nucleotidi, chiamati *Long Noncoding RNA* (lncRNA) (Batista e Chang, 2013). Gli lncRNA hanno la capacità di rendere la cromatina più o meno ricettiva all'azione dei fattori di trascrizione, oppure possono legarsi ad essi e traslocarli in altri siti; inoltre hanno un ruolo fondamentale nel silenziamento del cromosoma X e, più in generale, nell'imprinting del genoma. I microRNA sono tuttora sottoposti a varie ricerche per il fatto di essere parte del corredo genetico ed epigenetico che lo spermatozoo trasferisce all'ovulo (Johnson, 2011) e soprattutto per la loro potenzialità diagnostica di alcuni tumori, tra cui il cancro del colon e del pancreas; inoltre sono oggetto di studio anti-microRNA con funzioni terapeutiche, in particolare per le malattie cardiovascolari (Setoyama et al., 2011; Nature reprint collection, 2013).

Dunque l'RNA non è più solo il veicolo di trasmissione del codice genetico associato alla sintesi proteica, ma viene ad assumere le caratteristiche di un segnale modulatore molto complesso e articolato.

E' importante sottolineare, infine, che i meccanismi epigenetici descritti non sono autocatalitici, ovvero non operano in autonomia, ma in un contesto di segnali; sono influenzati, infatti, da un network di fattori di trascrizione di varia natura, che stabilisce le vie di attivazione genica che verranno segnate epigeneticamente (Waterland e Michels, 2007). Questi fattori di trascrizione sono numerosi: tra i più studiati ci sono quelli che sono attivati dagli ormoni (estrogeni e cortisolo soprattutto) e dalla vitamina D; grande importanza riveste il fattore NF-kB, che attiva oltre 400 geni, la maggior parte dei quali codificano per sostanze infiammatorie (citochine, proteine di adesione, ecc.) e per fattori di crescita cellulare.

Inoltre i diversi meccanismi epigenetici non operano separatamente l'uno dall'altro, ma in una rete di interrelazioni, come hanno dimostrato gli studi sul silenziamento genico, che vedremo meglio in seguito, dove è chiaramente evidente la connessione tra enzimi metilanti il DNA ed enzimi deacetilanti le code istoniche (Gold e Pedersen, 1994), e come ha

dimostrato anche la scoperta della prima proteina in grado di orientare la metilazione sulle sequenze CpG, attraverso la formazione di un complesso con il DNA, chiamata MeCP1 (*Methyl-CpG-binding protein 1*) (Meehan et al., 1989), seguita pochi anni dopo dalla scoperta della proteina MeCP2 (Meehan et al., 1992).

La MeCP2, al contrario della prima, è in grado di legare anche una singola sequenza CpG, non lega sequenze emimetilate e presenta almeno due domini di legame con il DNA; uno di questi lega la 5-metil-citosina, l'altro è un dominio di repressione trascrizionale che interagisce con un complesso co-repressore contenente un enzima Istone-deacetilasi; la funzione della proteina MeCP2, quindi, è quella di determinare la deacetilazione degli istoni, inducendo la condensazione della cromatina e il conseguente silenziamento trascrizionale (Nan, 1998). Queste osservazioni permisero, per la prima volta, di collegare la metilazione del DNA e l'acetilazione istonica alla repressione della trascrizione.

Le alterazioni del gene MeCP2 sul cromosoma X (Xq28) sono responsabili della *Sindrome di Rett*, un raro e grave disordine progressivo del neurosviluppo che si manifesta nella prima infanzia dopo il sesto mese di vita e che colpisce quasi esclusivamente le bambine, mentre nel maschio è letale, provocando gravi disabilità a vari livelli, soprattutto intellettive (Neri e Genuardi, 2010). Studi condotti su tessuti cerebrali di bambine affette hanno rilevato la presenza di cellule corticali più piccole, più compatte e meno arborizzate rispetto a quelle di individui di controllo a livello della corteccia motoria e prefrontale, infatti MeCP2 svolge un ruolo importante nello sviluppo post-natale dei neuroni, in particolare delle arborizzazioni e delle spine dendritiche, fondamentali affinché si instauri la fitta rete sinaptica neuronale, avendo come target principale il "*brain derived neurotrophic factor*" (BDNF) (Sun e Wu, 2006). Ne consegue che un suo malfunzionamento porti a difetti nella maturazione neuronale e nella sinaptogenesi, con una distribuzione temporale e tissutale specifica.



## EPIGENETICA NELLE PRIME FASI DELLA VITA

Da quanto esposto fino a qui è intuibile che la modulazione epigenetica interviene fin dalle prime fasi della vita, in particolare, come vedremo, durante la maturazione delle cellule germinali e, in seguito alla fecondazione, durante la fase dello sviluppo embrionale pre-impianto; inoltre, come ho già spiegato, l'epigenetica guida la differenziazione cellulare nei singoli tessuti, consentendo la definizione delle cellule dell'organismo sul piano morfofunzionale.

### *Imprinting genomico*

Il fenomeno dell'*imprinting genomico* costituisce un ulteriore meccanismo di regolazione epigenetica della trascrizione e consiste nell'espressione selettiva di uno dei due alleli di un gene, in dipendenza dal genitore da cui il cromosoma recante l'allele stesso è stato ricevuto (esclusione allelica dipendente dall'origine parentale nelle cellule diploidi). Nei geni sottoposti ad *imprinting*, quindi, sarà sempre espresso o solo l'allele materno o solo quello paterno; ad esempio, un gene è sottoposto ad *imprinting* materno quando viene inibita selettivamente l'espressione dell'allele materno e la proteina viene prodotta a partire solo dall'allele paterno.

Questo fenomeno non è stato descritto in tutti gli organismi; ad oggi è stato dimostrato in semi di piante, in alcuni insetti e nei mammiferi; nelle specie in cui si verifica è indispensabile per il corretto funzionamento del genoma; ad oggi sono stati scoperti circa 200 geni *imprinting* nel topo e circa 150 nell'uomo; rappresentano, quindi, meno dell'1% del totale del genoma umano, ma sono geni molto importanti, come vedremo, per lo sviluppo di un nuovo organismo. Nell'uomo la maggioranza dei geni sottoposti ad *imprinting* è autosomica, ed è stato osservato che essi si trovano raggruppati in due localizzazioni principali del genoma: sul cromosoma 11 (11p15.5) e sul cromosoma 15 (15q11-q13) (Russel, 2007).

Il meccanismo molecolare con cui la cellula realizza il fenomeno dell'*imprinting* iniziò ad essere chiarito nel corso degli anni '80: grazie all'affinamento delle tecniche di trasferimento dei nuclei cellulari si riuscì a generare embrioni con patrimonio genetico integralmente proveniente dal padre o dalla madre (Barton et al., 1984); essi risultarono letali, non potendo raggiungere uno sviluppo completo, ma riuscirono a chiarire come il patrimonio genetico paterno sia essenziale per un corretto sviluppo dell'apparato placentare, mentre quello materno guidi il corretto sviluppo dell'embrione. Queste osservazioni portarono l'interesse dei ricercatori sugli aspetti molecolari del patrimonio genetico paterno e materno, finché dagli studi di Monk emerse una diversa distribuzione dei metili a seconda della provenienza parentale (Monk, 1988); egli ipotizzò che la metilazione, essendo associata all'inattivazione dei geni, fosse in grado di guidare l'attivazione o l'inibizione degli alleli durante il differenziamento cellulare.

Negli anni '90, attraverso esperimenti condotti sui topi, fu dimostrato il ruolo della metilazione nel guidare il fenomeno dell'*imprinting* parentale, durante la gametogenesi e le prime fasi dell'embriogenesi, grazie ad un programma prestabilito di demetilazione e rimetilazione di specifiche sequenze (Gold e Pedersen, 1994). La riprogrammazione epigenetica avviene in due fasi: durante la maturazione delle cellule germinali e durante la fase di pre-impianto.

Le cellule germinali primordiali giungono a maturazione durante un lungo periodo di tempo; nell'embrione di topo la demetilazione avviene tra l'undicesimo e il dodicesimo giorno e coinvolge anche i geni che manifestano *imprinting*; dopo la demetilazione i gameti vengono rimetilati ed acquisiscono l'*imprinting* (Bestor e Ingram, 1983; Morgan et al., 2005); questo processo continua fino al diciottesimo giorno nel maschio e nella femmina fino alla maturazione degli oociti prima dell'ovulazione. In seguito alla fecondazione si verifica la seconda fase di riprogrammazione epigenetica: durante la fase di sviluppo pre-impianto, infatti, il genoma paterno va incontro ad una demetilazione generalizzata con un processo attivo, che conduce nella blastula ad uno stato di ipometilazione, con perdita della distribuzione dei metili proveniente dai gameti parentali; il genoma materno, invece, subisce una demetilazione più lenta e passiva in seguito alla replicazione cellulare fino alla blastocisti; in questa fase i geni con *imprinting* non vengono coinvolti e conservano, quindi, il

loro assetto epigenetico. Poco dopo l'impianto si verifica un processo di metilazione *de novo* lungo tutto il genoma, che coincide approssimativamente con le prime due ondate di replicazione mitotica della blastocisti, fino allo sviluppo post-impianto. Successivamente è stato documentato anche il ruolo della modificazione delle code istoniche (Hugh et al., 2005); poco dopo la fecondazione il genoma paterno scambia protamine (proteine nucleari ricche di Arginina che sostituiscono gli istoni durante la spermatogenesi) (Braun, 2001) con gli istoni ereditati per via materna (Adenot et al., 1997) e nel genoma materno gli istoni H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> di nuova sintesi conservano l'acetilazione sui residui di Lisina, rispettivamente su Lys9 e Lys27 (Erhardt et al., 2003; Liu et al., 2004) e su Lys5 e Lys12 (Sobel et al., 1995); in seguito si osserva la mono-, di- e trimetilazione degli istoni, che presenta una temporizzazione specifica (Santos et al., 2005). Quindi, nello zigote, l'acquisizione di uno stato della cromatina iperacetilato e ipometilato può favorire l'accessibilità del genoma paterno e consentire che si verifichi un ulteriore rimodellamento; al contrario, il genoma materno mantiene le modificazioni degli istoni che sono state acquisite durante la crescita dell'ovocita sia nello zigote (Santos et al., 2005) che nel corso della successiva divisione cellulare (Liu et al., 2004; Pushendorf et al., 2008).

Quindi, l'*imprinting* primario durante la gametogenesi marca in modo differenziale gli alleli parentali; dopo la fecondazione gli *imprinting* vengono modificati in modo da determinare un'espressione monoallelica specifica dei geni. L'importanza funzionale di questa programmazione asimmetrica delle modificazioni della cromatina non è ancora stata completamente chiarita, tuttavia, i risultati di questi studi suggeriscono che essa sia necessaria per stabilire il corretto programma di sviluppo nello zigote, ovvero per guidare l'interazione tra ereditarietà e riprogrammazione epigenetica dei gameti, che darà origine allo zigote totipotente (Gill et al., 2012).

Inoltre, venne scoperto il primo sistema di geni sotto controllo di imprinting genomico, identificato con la sigla *Igf2-H19* (Surani et al., 1984; DeChiara, 1991; Hark et al., 2000); la sigla *Igf2* significa *Insulin-like growth factor 2* e rappresenta il gene che esprime la proteina somatomedina A, con struttura simile all'insulina e con la funzione di stimolazione della crescita durante la gestazione; il gene *H19*, invece, esprime una lunga catena di RNA non codificante. Entrambi i geni sono sotto il controllo di un *enhancer*, ovvero di una sequenza

genica che ne potenzia l'attività e l'espressione, e di un *Imprinted Control Element* (ICR), ovvero di una sequenza di controllo; nel cromosoma queste strutture si trovano nell'ordine enhancer, H19, ICR, Igf2. Nel cromosoma materno l'enhancer consente l'espressione di H19, ma non quella di Igf2, a causa di un fattore proteico legato alla sequenza ICR; nel cromosoma paterno, invece, la sequenza ICR, essendo metilata, non consente il legame con il fattore proteico, con conseguente attivazione dell'espressione di Igf2, che, a sua volta, induce la metilazione di H19 reprimendone l'espressione; quindi ciò che guida questo complesso sistema di controllo è il silenziamento trascrizionale mediato dalla metilazione di una specifica sequenza (Hark et al., 2000). Al gene H19, ad esempio, è legata la Sindrome di Beckwith-Wiedemann (Hiura et al., 2012), un raro disordine dell'*imprinting* caratterizzato da eccesso di crescita pre-natale, macroglossia, onfalocele, visceromegalia, angiomi multipli, ipoglicemia neonatale e aumentata incidenza di patologie neoplastiche infantili (Neri e Genuardi, 2010). E' interessante notare che l'incidenza di questa sindrome aumenta di nove volte in seguito a fecondazione *in vitro* rispetto ai concepiti naturalmente (Hansen et al., 2002; DeBaun et al., 2009), in quanto sembra che le tecniche di riproduzione assistita possano far aumentare la frequenza di errori di *imprinting*.

Questi esempi ci permettono di affermare che l'*imprinting* genomico è il risultato della combinazione dei meccanismi di metilazione del DNA e di deacetilazione delle code istoniche, che agiscono insieme seguendo due possibili vie: l'enzima DNA-metiltransferasi, dopo aver metilato il DNA, richiama l'enzima Istone-deacetilasi, che completa il silenziamento cancellando le acetilazioni sulle code istoniche; oppure si verifica per primo il meccanismo della deacetilazione, l'enzima Istone-deacetilasi richiama l'enzima DNA-metiltransferasi, il quale completa il silenziamento metilando il DNA (Bottaccioli, 2014).

A difetti dell'*imprinting* genomico possono essere legate anche altre malattie: la *Sindrome di Angelman*, ad esempio, in circa il 3% dei casi è dovuta ad alterazioni a livello di alcuni geni del braccio lungo del cromosoma 15 (15q11.2-q13) con duplicazione del cromosoma paterno (Neri e Genuardi, 2010), ed anche per questa sindrome è stato osservato un aumento dell'incidenza in seguito a tecniche di riproduzione assistita (Doyle et al., 1992; Schieve et al., 2002); la *Sindrome di Prader-Willy* nel 3-5% dei casi presenta alterazioni dell'*imprinting* a livello degli stessi geni del cromosoma 15, ma la duplicazione riguarda il cromosoma

materno (Neri e Genuardi, 2010); la *Sindrome di Silver-Russel*, infine, presenta nel 10% dei casi duplicazione del cromosoma 7 materno (7p11-p13 e 7q31-qter), mentre in circa il 30% dei casi presenta ipometilazione del gene H19, localizzato nella regione 11p15 soggetta ad *imprinting* (Neri e Genuardi, 2010).

Queste scoperte hanno portato alla ricerca di possibili interventi terapeutici che permettano la riacquisizione dell'*imprinting* (Kopelovich et al., 2003).

### *Silenziamento del cromosoma X*

Come accennato precedentemente, per compensare il diverso dosaggio genico delle femmine, che hanno due cromosomi X, rispetto ai maschi, che ne hanno uno solo, si ha la disattivazione di uno dei due cromosomi X nella femmina, generando una struttura condensata detta “corpo di Barr”.

Il silenziamento del secondo cromosoma X avviene intorno al sedicesimo giorno dopo la fecondazione, quando le cellule sono ancora poche centinaia; l'inattivazione è casuale, ovvero circa la metà delle cellule avrà inattivo il cromosoma X paterno e attivo quello materno e l'altra metà viceversa; questo rende la femmina un mosaico, in quanto ha cellule che usano le informazioni contenute nel cromosoma X della madre e altre cellule che usano le informazioni contenute nel cromosoma X del padre (Migeon, 2007).

Il cromosoma X è uno dei più grandi del genoma umano e contiene circa 1100 geni, che rivestono funzioni molto importanti sia a livello del sistema immunitario che a livello cerebrale; contiene, infatti, il più elevato numero di geni correlati al sistema immunitario di tutto il genoma, oltre a geni che codificano per un altrettanto rilevante numero di microRNA (Bianchi et al., 2012).

E' ormai documentata una differenza significativa tra il genere maschile e il genere femminile per quanto riguarda la sopravvivenza e la predisposizione ad andare incontro, nel corso della vita, ad alcune malattie piuttosto che ad altre: le donne mediamente vivono di più, si ammalano meno rispetto agli uomini di malattie infettive e tumori, ma sono più vulnerabili alle malattie infiammatorie e autoimmuni (Selmi et al., 2012). Senza dubbio una parte di questo fenomeno è da imputare al diverso ruolo che hanno gli ormoni estradiolo e

testosterone nei confronti dell'immunità e della risposta infiammatoria, ma la loro importanza sembra rilevante solo per spiegare, al massimo, il funzionamento dell'immunità nella fase centrale della vita. Per questo le ricerche si sono indirizzate verso lo studio del ruolo del cromosoma X; il fatto che nelle femmine questo cromosoma sia presente in duplice copia può rappresentare sia un vantaggio che uno svantaggio: è stato dimostrato, infatti, un meccanismo chiamato "*skewing*" (spostamento), che consiste nello "spostare la bilancia" verso il cromosoma X silenziato; questo fenomeno è stato documentato nella popolazione femminile dopo i 55-60 anni, ed è stato associato ad una maggiore sopravvivenza; in particolare, in una popolazione femminile tra 73 e 101 anni, seguita per 13 anni, le donne che hanno presentato una maggiore attività di sbilanciamento sono sopravvissute più a lungo (Mengel-From et al., 2012). Questa maggiore flessibilità epigenetica nel genere femminile è stata osservata anche in un recente studio che ha comparato i due generi in una popolazione di 90 anni, dimostrando la maggior capacità di cambiamento dell'espressione genica delle donne rispetto ai maschi (Marttila et al., 2013). Sembra, però, che un alto grado di *skewing* in età giovanile possa comportare alcuni problemi; è stato documentato, ad esempio, che nei pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico (LES) è presente una parziale riattivazione del cromosoma X silenziato; questo comporta l'iperattività del gene che codifica per un recettore linfocitario (CD40L), il quale induce i linfociti B ad una sovrapproduzione di anticorpi (Harrison, 2006). Il LES è una malattia autoimmune che presenta un rapporto di incidenza femmina-maschio di 9:1, si sviluppa in età giovanile (tra i 20 e i 30 anni) ed è caratterizzata da una produzione esagerata di autoanticorpi.

Il cromosoma X, quindi, se da un lato è in grado di conferire una maggiore flessibilità all'immunità femminile, dall'altro può essere un punto di vulnerabilità epigenetica (Selmi et al., 2012), in quanto può costituire il bersaglio di numerosi fattori sociali, ambientali e comportamentali che concorrono alla genesi delle malattie autoimmuni (Bottaccioli, 2008; Greer e McCombe, 2012).

Inoltre, a livello cerebrale, il ruolo del cromosoma X sembra essere altrettanto rilevante, anche se ad oggi meno studiato e quindi meno conosciuto; il suo ruolo sembra riguardare la formazione della morfologia cerebrale, come dimostrerebbero gli studi su donne affette da sindrome di Turner, anomalia cromosomica caratterizzata dalla presenza di un solo

cromosoma X, per un totale di 45 cromosomi anziché 46. Il loro cervello ha una morfologia diversa rispetto a quella dei controlli sani e ancora più interessante è l'osservazione che le donne affette che hanno ereditato il cromosoma X paterno mostrano una conformazione cerebrale diversa rispetto a quelle che hanno ereditato il cromosoma X materno (Lepage et al., 2013).

### *Il ruolo dello stress nelle prime fasi della vita*

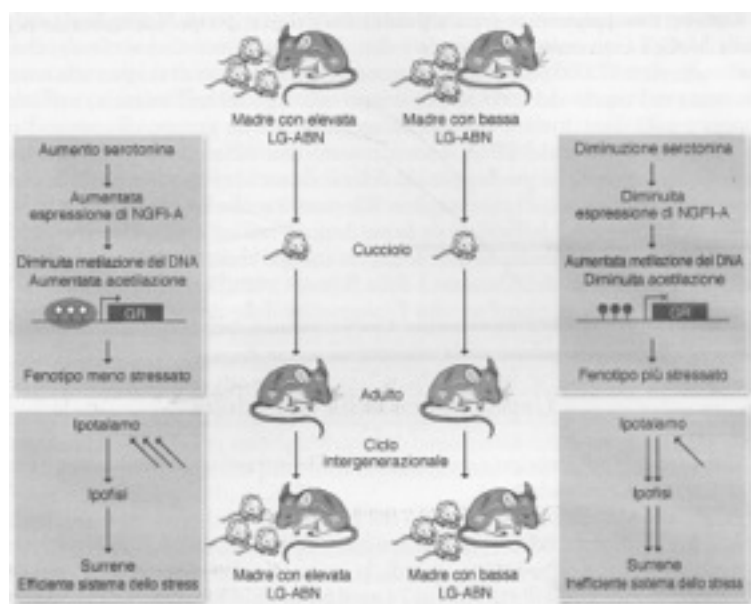
Sigmund Freud per primo evidenziò l'importanza delle prime esperienze di vita nel condizionare le modalità di regolazione delle emozioni e la possibile insorgenza di patologie psichiatriche da adulto; a partire dagli anni '40 del Novecento, poi, con John Bowlby la ricerca in psicotica si è indirizzata verso lo studio dei legami che si formano tra il bambino e la sua principale figura di attaccamento, il “*caregiver*” (generalmente la madre), arrivando a definire diversi “stili di attaccamento”, i quali saranno la base che guiderà il bambino per tutta la sua vita, ovvero i modelli per la regolazione delle sue emozioni e per stabilire le relazioni con gli altri, dall'infanzia all'età adulta (Bowlby, 1989).

Quando si parla di emozioni, è implicito fare riferimento anche alla “reazione di stress”; come è emerso dalle ricerche di Hans Selye nella prima metà del Novecento, lo stress è una risposta aspecifica dell'organismo ad ogni richiesta effettuata su di esso da stimoli (agenti stressanti) di diversa natura, che però provocano nell'organismo la stessa reazione (Selye, 1936); la reazione di stress, infatti, può essere attivata da fattori diversi (psichici, sociali, ambientali, fisici) che, se da un punto di vista emotivo e affettivo provocano nell'individuo percezioni anche profondamente diverse, da un punto di vista biologico sottendono tutte la stessa reazione, definita da Selye stesso come “Sindrome generale di adattamento” (Selye, 1956), la quale consta di tre fasi:

- Fase di allarme, in cui si manifestano essenzialmente modificazioni di carattere biochimico-ormonale.
- Fase di resistenza, in cui l'organismo si organizza da un punto di vista anatomico-funzionale in senso difensivo, per far fronte agli agenti stressanti.

- Fase di esaurimento, nella quale si verifica il crollo delle difese e l'incapacità di adattarsi ulteriormente agli agenti stressanti.

Da diversi anni alla McGill University di Montréal vengono condotti studi sui ratti sulla connessione tra le relazioni materne e ambientali nelle prime fasi dello sviluppo e l'assetto dell'asse dello stress (asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene, HPA). Come mostra lo schema in figura 1, i ratti allevati da madri con un alto livello di cure mostrano un aumento della concentrazione di serotonina nel cervello, che determina l'aumento di un fattore di trascrizione cellulare (NGFI-A), il quale, tramite la diminuzione della metilazione del DNA e l'aumento dell'acetilazione, attiva il gene che regola la produzione dei recettori per i glucocorticoidi (GR) nell'ippocampo; ne risultano animali con un efficiente sistema dello stress, ed è stato anche osservato che le femmine riproducono poi, da adulte, lo stesso comportamento di cure amorevoli con i propri figli. Al contrario, i ratti allevati da madri con un basso livello di cure presentano una ipermetilazione a livello della Citosina e degli istoni del promotore del gene che regola la produzione dei recettori per i glucocorticoidi, con conseguente blocco dell'espressione genica; ne risultano animali che, nel corso del loro sviluppo, presentano un'alterazione della risposta di stress, ed anche in questo caso le femmine riproducono con i propri cuccioli lo stesso comportamento di cure poco amorevoli (Szyf et al., 2007).



**Figura 1** Relazioni materne e ambientali nelle prime fasi dello sviluppo.

Legenda: *NGFI-A*, clone A da fattore di crescita neuronale inducibile; *LG-ABN*, attitudine a leccare e pulire la prole.



Inoltre gli stessi autori hanno osservato che un'infusione centrale di un inibitore dell'acetilasi istonica è in grado di rimuovere le differenze nell'acetilazione istonica, nella metilazione del DNA, nell'espressione del recettore per i glucocorticoidi e nella risposta dell'asse HPA allo stress. Infine, è stato osservato che, quando i ratti nati da madri con un alto livello di cure vengono fatti allevare da madri scarsamente accudenti, nel loro ipotalamo si registra la metilazione del gene per i recettori dei glucocorticoidi, che porta questi animali a comportarsi come quelli nati da madri con un basso livello di cure; questo dimostra che è il comportamento materno a indurre la marcatura epigenetica e non una predisposizione genetica e dimostra anche la reversibilità di tale marcatura (McGowan et al., 2008).

Recentemente gli studi sono stati estesi anche all'uomo; sempre alla McGill University sono stati esaminati i cervelli di persone morte suicide, raccolti nel *Quebec Suicide Brain Bank*, che custodisce più di 3000 cervelli umani; nell'ippocampo dei morti suicidi, che avevano avuto una storia di maltrattamenti nell'infanzia, è stato riscontrato un incremento della metilazione dell'esone 1<sub>F</sub> (l'equivalente umano dell'esone 1<sub>7</sub> nei ratti, ipermetilato in seguito a scarse cure materne), a livello del gene che codifica per il recettore del cortisolo (GR) (Zhang et al., 2013a).

Inoltre, utilizzando i dati del *British Birth Cohort Study*, che ha coinvolto oltre 17.000 persone, sottoposte a regolari prelievi di sangue alla nascita, nell'infanzia, in adolescenza e a 45 anni di età, i ricercatori hanno effettuato su un gruppo di essi l'analisi della metilazione del DNA; i risultati hanno dimostrato una differenza statisticamente significativa tra le persone appartenenti ad un alto livello della scala sociale rispetto a quelle che vivevano in condizioni economiche e sociali più disagiate (Szyf et al., 2008); da notare anche la forte correlazione tra i livelli socioeconomici dell'infanzia e la metilazione in età adulta (Borghol, 2012; Lam et al., 2012).

Risulta evidente, quindi, il legame tra il sostegno familiare e le cure parentali e la salute del bambino e dell'adulto, ma anche la stretta dipendenza tra la qualità delle cure e le condizioni socioeconomiche della famiglia; una condizione di insicurezza familiare rende più insicuro lo stile di attaccamento del bambino, che può comportare la costruzione di una personalità insicura, basata epigeneticamente su un sistema di risposta allo stress molto

fragile, aumentando il rischio di esposizione a malattie anche di tipo psichiatrico, come mostrerò successivamente.

## **LA TEORIA DELLE ORIGINI EMBRIOFETALI DELLE MALATTIE DELL'ADULTO (DOHaD)**

*La teoria delle origini embrio-fetali delle malattie dell'adulto (D. Barker)*

Già a partire dal 1976 furono pubblicati i primi risultati di uno studio che indagava il ruolo dello stress in utero. Questo fu effettuato sui figli nati da donne gravide tra il novembre del 1944 e l'aprile del 1945, quando l'occupazione tedesca della parte occidentale dei Paesi Bassi nel corso della Seconda guerra mondiale aveva ridotto l'alimentazione della popolazione a 400-800 calorie al giorno, ovvero fino a sei volte meno della media normale, motivo per cui vennero chiamati “figli dell'inverno di fame” (Ravelli et al., 1998). Come era prevedibile, venne rilevato alla nascita un peso inferiore al normale, soprattutto nei figli delle donne che avevano sofferto la fame nell'ultimo trimestre della gravidanza, ma l'aspetto più interessante riguarda le conseguenze a lungo termine, che sono state osservate nel corso dei quarant'anni successivi e oltre; una volta diventati adulti, infatti, i “figli della fame” hanno mostrato un significativo aumento dell'incidenza di vari disturbi psichiatrici, quali disturbi d'ansia, dell'umore, disturbo di personalità antisociale, schizofrenia e un accelerato declino delle funzioni cognitive; inoltre, hanno manifestato una serie di disturbi organici, quali diabete, obesità e disturbi cardiovascolari (Roseboom et al., 2000; Roseboom et al., 2000; Roseboom et al., 2001; 2003; Painter et al., 2005; Kyle e Pichard, 2006; Stein et al., 2006; Painter et al., 2008; Schulz, 2010).

Fu in seguito a queste e ad altre osservazioni che alla fine degli anni '80 l'epidemiologo britannico David J. Barker elaborò la sua teoria sulle origini embrio-fetali delle malattie dell'adulto (Barker et al., 1989; Barker, 1995; 1998).

L'ipotesi afferma che la carenza nutrizionale materna nel corso della gestazione, che porta ad un rallentamento della crescita del feto, programma l'insorgenza in età adulta di cardiopatia coronarica e dei disturbi ad essa associati, quali infarto, ipertensione e diabete di tipo 2 (Barker et al., 1989; Barker et al., 1993; Barker, 1994). Nel periodo fetale, dalla nona settimana dopo il concepimento in poi, inizia una fase di rapida crescita caratterizzata dalla

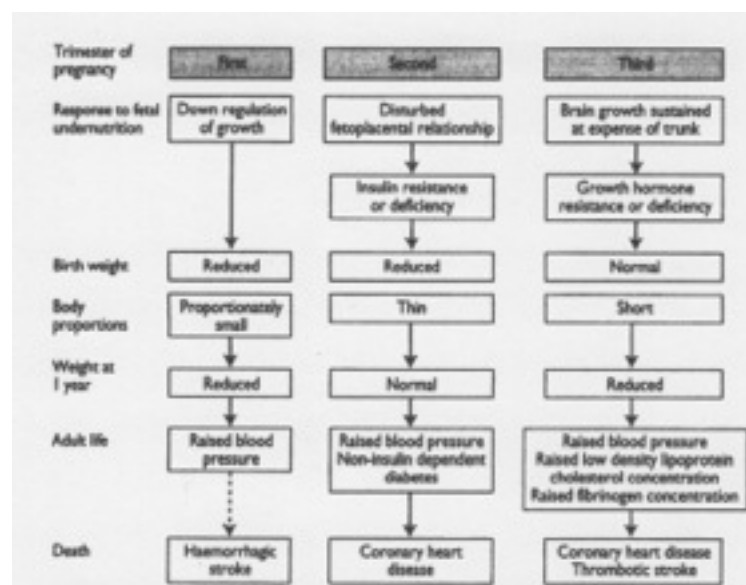
divisione cellulare; differenti tessuti crescono durante questa fase, ognuno con tempi diversi, per questo definiti “periodi critici” (Widdowson e McCance, 1975). La crescita dipende dai nutrienti e dall’ossigeno, quindi la carenza nutrizionale può rallentare la divisione cellulare sia attraverso un effetto diretto, sia attraverso l’alterazione delle concentrazioni di ormoni e fattori di crescita, tra cui i più importanti sono l’insulina e l’ormone della crescita. Widdowson e McCance furono i primi ad osservare che brevi periodi di carenza nutrizionale possono ridurre in modo permanente il numero delle cellule in determinati organi (Widdowson e McCance, 1974; 1975), così come possono indurre cambiamenti nella distribuzione dei tipi cellulari, nei modelli di secrezione ormonale, nell’attività metabolica e nella struttura degli organi (Lucas, 1991); ma l’ipotesi di Barker afferma qualcosa di ancora diverso: la carenza nutrizionale materna precoce può essere in grado di indurre una memoria nel feto che si traduce poi, da adulto, in patologia (Barker et al., 1989; Barker et al., 1993; Barker, 1994).

Studi condotti sugli animali, tra l’altro, avevano mostrato che la carenza nutrizionale in utero, anche per brevi periodi, era in grado di provocare cambiamenti persistenti nella pressione sanguigna, nel metabolismo del colesterolo, nella risposta dell’insulina al glucosio e in una serie di altri parametri metabolici, endocrini e immunologici (Widdowson e McCance, 1974; Barker, 1994).

I primi studi epidemiologici sull’uomo che rilevarono una possibile importanza della programmazione fetale nella cardiopatia coronarica si basarono sull’esame di 16000 persone tra uomini e donne di media o tarda età nate nel Regno Unito, il cui peso alla nascita era stato registrato; questi studi rilevarono che le morti per cardiopatia coronarica erano avvenute per coloro che alla nascita avevano un peso inferiore a 2,5 Kg e per coloro che avevano un peso superiore ai 4,3 Kg (Osmond et al., 1993) e che il rischio di malattia era più alto nei nati prematuri (Barker et al., 1993); inoltre il basso peso alla nascita risultò associato con la “Sindrome da insulino-resistenza”, che consiste nella compromissione della tolleranza al glucosio, nell’aumento della pressione sanguigna e in un alterato metabolismo lipidico nell’età adulta (Barker et al., 1993; Phillips et al., 1994); disordini nel metabolismo del colesterolo e nella coagulazione sanguigna furono associati con dimensioni del corpo sproporzionate in relazione alle dimensioni della testa, in seguito a carenza nutrizionale

nell'ultimo periodo della gestazione (Dicke, 1987); inoltre, la persistenza dell'aumento della pressione sanguigna sembrò essere associata con interferenze nella crescita del feto in tutte le fasi della gravidanza (Law et al., 1993). Nel corso di queste ricerche venne anche osservato che negli uomini uno scarso sviluppo della crescita ad un anno di età era predittivo dell'insorgenza di cardiopatia coronarica in età adulta (Osmond et al., 1993); in particolare, coloro che ad un anno avevano un basso peso (circa 7 Kg) presentavano una probabilità tre volte maggiore di mortalità per cardiopatia coronarica rispetto a coloro che avevano un alto peso (circa 12 Kg) e questa correlazione era indipendente dal modo in cui i bambini erano stati alimentati (Fall et al., 1995). Infine, venne rilevato che i casi di maggiore aumento della pressione sanguigna in età adulta erano presenti in coloro che, pur avendo un basso peso alla nascita, avevano un placenta molto estesa, indipendentemente dalla durata della gestazione (Barker et al., 1990; Barker, 1994; Paneth e Susser, 1995); altri studi, tra l'altro, avevano mostrato che l'ingrossamento della placenta era seguito da compromissione della tolleranza al glucosio, disordini nella coagulazione del sangue e morte per cardiopatia coronarica (Barker, 1994).

Questa serie di studi portò Barker alla pubblicazione di un *framework*, all'interno del quale potesse essere esplorata la correlazione tra carenza nutrizionale fetale e disturbi cardiovascolari (Barker et al., 1993; Barker, 1994), riportata in figura 1.



**Figura 1** Framework all'interno dell'ipotesi dell'origine fetale che collega la carenza nutrizionale materna con l'insorgenza di disturbi cardiovascolari nella prole adulta.

Barker stesso la definì come un'ipotesi di lavoro che avrebbe avuto la necessità di essere rivalutata via via che nuove conoscenze fossero diventate disponibili (Barker, 1995).

Negli anni a seguire la teoria di Barker ha avuto molteplici e importanti riscontri epidemiologici (Leon et al., 1998; Hyppönen et al., 2001; Leon e Koupilová, 2001).

Per quanto riguarda gli studi sull'inverno di fame in Olanda, in particolare, è stato osservato che l'insorgenza in età adulta dei disturbi dipendeva dalla fase della gestazione in cui il feto era stato esposto alla carenza nutrizionale: coloro che erano stati concepiti durante la carestia presentavano elevati livelli di colesterolo e aumentata incidenza di cardiopatia coronarica; coloro che erano stati concepiti prima dell'inizio della carestia e che, quindi, erano stati esposti nella fase centrale o alla fine della gestazione presentavano insulino-resistenza e ridotta tolleranza al glucosio (Ravelli et al., 1998; Roseboom et al., 2001).

Queste differenze riflettono presumibilmente periodi sensibili nello sviluppo di organi, quali fegato, cuore e muscolo, che si verificano in fasi diverse dello sviluppo fetale; ad esempio, è stato osservato che l'insorgenza di diabete di tipo 2 è associata ad un rallentamento della crescita tra la nascita e i tre mesi di vita, che può coincidere con un periodo sensibile per la produzione di insulina da parte del pancreas (Eriksson et al., 2003b); inoltre, nei bambini con un basso peso alla nascita e ad un anno di età, è stato osservato tra i 3 e gli 8 anni il fenomeno di "adiposity rebound", che è stato associato ad una maggiore incidenza del diabete di tipo 2 (Rolland-Cachera et al., 1987; Forsén et al., 2000; Eriksson et al., 2001; Barker et al., 2002a; Eriksson et al., 2003a), associazione replicata più recentemente in uno studio longitudinale in India (Bhargava et al., 2004) e supportata dall'ipotesi secondo cui lo sviluppo di un alto indice di massa corporea nella tarda infanzia può portare ad una massa con un contenuto di grassi sproporzionatamente alto rispetto alla massa magra, che porterà all'insulino-resistenza (Eriksson et al., 2002a).

Inoltre, l'associazione tra basso peso alla nascita e cardiopatia coronarica è stata replicata in Europa, USA e India (Osmond et al., 1993; Valdez et al., 1994; Curhan et al., 1996; Curhan et al., 1996; Frankel et al., 1996; Stein et al., 1996; Rich-Edwards et al., 1997; Leon et al., 1998; Eriksson et al., 2001), così come in vari Paesi del mondo è stata confermata la capacità predittiva del basso peso alla nascita nei confronti dell'insorgenza del diabete di tipo

2 (Hales et al., 1991; McCance et al., 1994; Yajnik et al., 1995; Lithell et al., 1996; Rich-Edwards et al., 1996; Rich-Edwards et al., 1999; Forsén et al., 2000).

Oltre alle malattie metaboliche e cardiovascolari, altri studi epidemiologici e clinici hanno mostrato la relazione tra basso peso alla nascita e una serie di altre condizioni patologiche; a questo proposito, molto interessante è l'osservazione per cui le persone con basso peso alla nascita presentano persistenti alterazioni della risposta di stress, tra cui aumento delle concentrazioni sieriche di cortisolo (Phillips et al., 2000), che influiscono, ad esempio, sulla fisiologia della riproduzione, come è stato osservato negli animali (Barraclough, 1961; Barker, 1998) e in seguito nell'uomo (Cooper et al., 1996; Cresswell et al., 1997; Adair, 2001), oppure sull'insorgenza di disturbi dell'umore, tra cui la depressione (Gale e Martyn, 2004), che predispone al suicidio (Barker et al., 1995); nei pazienti affetti da depressione con basso peso alla nascita, infatti, sono state rilevate una secrezione anomala dell'ormone della crescita e anomalie nell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) e nell'asse ipotalamo-tiroide (Checkley, 1992); è stata osservata anche un'associazione con la schizofrenia (Wahlbeck et al., 2001) e con lo sviluppo delle abilità cognitive (Jefferis et al., 2002).

Inoltre, in letteratura si trovano evidenze anche circa l'origine fetale dell'osteoporosi (Cooper et al., 2000; Dennison et al., 2001; Cooper et al., 2002), dell'asma e della malattia polmonare cronica ostruttiva (Barker et al., 1991) e di alcuni tipi di cancro (Ekbom et al., 1992; Michels et al., 1996; Sanderson et al., 1996; Ahlgren et al., 2004).

Come osservato dallo stesso Barker, però, la sua ipotesi, nonostante le moltissime conferme epidemiologiche, mancava di una spiegazione causale.

Nel 1992 Barker e Hales fornirono una spiegazione non genetica alla teoria dell'origine embrio-fetale delle malattie, attraverso l'ipotesi del "fenotipo parsimonioso" (Hales e Barker, 1992), secondo la quale il feto, sottoposto ad una privazione nutrizionale, avrebbe limitato la sua crescita attraverso lo sviluppo di insulino-resistenza per poter sopravvivere alla nascita; anche se questo poteva fornire un vantaggio nell'immediato, nel caso in cui l'ambiente dopo la nascita avesse continuato ad essere sfavorevole, si sarebbe trasformato in un aumento del rischio di incidenza della malattia in seguito, se nella vita extrauterina l'ambiente nutrizionale fosse stato arricchito. Il feto, quindi, adatterebbe il proprio fenotipo all'ambiente in risposta a stimoli nutrizionali o ormonali provenienti dalla madre (Gluckman et al., 2005); queste

risposte possono essere adattive o predittive o entrambe, e fanno parte dei processi di plasticità dello sviluppo (Bateson et al., 2004; Gluckman e Hanson, 2004; Gluckman et al., 2005); la plasticità, infatti, fornisce all'organismo la capacità di rispondere ai cambiamenti ambientali; se l'ambiente è instabile o ostile, la plasticità aumenta la probabilità di sopravvivenza dell'organismo in quell'ambiente (Gluckman et al., 2005). Kuzawa, in particolare, ha sottolineato il valore evolutivo delle risposte predittive, le quali permetterebbero al feto di anticipare il suo probabile ambiente futuro (Kuzawa, 2005); inoltre, è stata evidenziata l'importanza della composizione corporea materna nel momento del concepimento come elemento determinante per lo sviluppo embrionale (Bloomfield et al., 2003; Ronnenberg et al., 2003; MacLaughlin et al., 2005; Painter et al., 2005).

Ad esempio, l'obesità infantile potrebbe rappresentare una previsione di bisogno per le riserve adipose, al fine di salvaguardare il cervello contro carenze nutrizionali durante e dopo lo svezzamento (Kuzawa et al., 2007), mentre la pubertà precoce sarebbe una risposta alla previsione di elevata mortalità, al fine di anticipare il periodo riproduttivo per garantire il flusso genico alla generazione successiva (Sloboda et al., 2007).

Questi ed altri studi portano, quindi, evidenze crescenti del fatto che la composizione corporea di una donna e la sua nutrizione nel momento del concepimento e durante tutta la gravidanza svolgono un ruolo fondamentale nel determinare il benessere permanente dei suoi figli.

Negli ultimi dieci anni una quantità crescente di dati sperimentali ha suggerito che i processi epigenetici possono essere in grado di spiegare una parte considerevole dell'ipotesi di Barker.

Gli studi sulla differenziazione dei tessuti effettuati a partire dalle cellule staminali hanno mostrato chiaramente che i meccanismi epigenetici della metilazione del DNA e della modificazione degli istoni sono fondamentali per la differenziazione cellulare e per la plasticità nel periodo dello sviluppo (Reik, 2007); ricerche sui ratti (Lillycrop et al., 2005; Lillycrop et al., 2007; Park et al., 2008) e sui primati (Aagaard-Tillery et al., 2008) hanno permesso di osservare modificazioni epigenetiche nei geni associati al metabolismo e alle funzioni endocrine, in risposta allo stato nutrizionale materno. Inoltre, nelle pecore è stato osservato che una dieta carente di gruppi metilici nel periodo del concepimento ha portato ad



un'alterazione del 4% della metilazione delle isole CpG nella prole, soprattutto maschile, portando in età adulta ad obesità, insulino-resistenza, elevata pressione sanguigna, bassa massa muscolare ed alterata risposta immunitaria (Sinclair et al., 2007).

Oltre al meccanismo della metilazione del DNA, sta emergendo anche l'importanza degli RNA non-codificanti nel fenomeno dello sviluppo pre- e post-natale (Amaral et al., 2008).

A conferma di queste osservazioni è stato dimostrato che l'integrazione di folati (donatori di metili) nella dieta materna ha impedito i cambiamenti nel fenotipo metabolico e nello stesso tempo le modificazioni epigenetiche (Lillicropo et al., 2005); inoltre, anche la somministrazione di leptina in topi appena nati è stata in grado di impedire lo sviluppo del fenotipo metabolico (Vickers et al., 2005) e questo effetto è stato associato alla normalizzazione sia dell'espressione che delle modificazioni della metilazione (Gluckman et al., 2007); la leptina è uno dei principali ormoni prodotti dal tessuto adiposo ed ha la funzione di regolare il senso di sazietà, diminuendo il senso della fame e favorendo, quindi, la riduzione del peso corporeo e della massa grassa.

La prima evidenza scientifica nell'uomo, che ha dimostrato che le condizioni ambientali in utero possono causare cambiamenti epigenetici che persistono per il resto della vita, è stata fornita nel 2008; lo studio ha mostrato che i "figli della fame", a distanza di sessant'anni, presentavano una metilazione minore del gene che controlla la sintesi di Igf2 (Heijmans et al., 2008; Tobi et al., 2009), il fattore insulino-simile che regola la crescita del feto e che, se è scarsamente attivo, determina un basso peso alla nascita (St-Pierre et al., 2012) e che regola anche l'omeostasi cellulare, attività che lo rende implicato anche nella genesi del cancro e di altre patologie (Chao e D'Amore, 2008).

### *Le critiche alla teoria di Barker*

Le prime critiche furono rivolte al modello del "fenotipo parsimonioso" proposto da Barker e Hales e si basarono sull'osservazione che i bambini nati con un basso peso non sviluppavano insulino-resistenza subito, ma più tardi dopo la nascita; in alcuni modelli animali di DOHaD, poi, l'insulino-resistenza era preceduta da un periodo di maggiore sensibilità all'insulina (Reusens e Remacle, 2009).

Inoltre, vennero considerati limiti del modello il fatto che esso aveva disposto la crescita fetale su un percorso causale, assumendo che il cambiamento nello sviluppo fosse sempre indotto da segnali di privazione e che ci fosse la necessità di un grave insulto o stress per il feto; in particolare, l'attenzione che Barker aveva posto sul basso peso alla nascita fu oggetto di numerose critiche, che rallentarono i progressi della ricerca in questo campo e alimentarono il pensiero di molti ricercatori che sostenevano che le variabili di confondimento non fossero state prese adeguatamente in considerazione (Dawes et al., 1990; Huxley et al., 2002).

Tutte queste critiche non sono state ritenute valide alla luce delle considerazioni di Bateson, Gluckman, Hanson e Barker stesso, i quali hanno continuato a sostenere che l'embrione, il feto e il neonato sono in grado di trarre informazioni dall'ambiente e di regolare il proprio sviluppo di conseguenza, anche se, così facendo, potrebbero poi soffrire di conseguenze a lungo termine; questo significa che hanno considerato la DOHaD come una manifestazione dei normali processi di sviluppo che si verificano grazie al fenomeno della plasticità (Bateson, 2001; Gluckman e Hanson, 2004; Bateson et al., 2004). La plasticità, infatti, permette lo sviluppo di un organismo capace di rispondere ai cambiamenti ambientali, sia favorevoli che sfavorevoli, che possono verificarsi su una scala temporale che può andare da una a diverse generazioni, al fine di rendere più probabile la sopravvivenza.

Inoltre, sono state portate evidenze del fatto che l'ipotesi secondo cui non sarebbero le avverse condizioni intrauterine responsabili delle malattie dell'adulto, bensì il fatto di essere stati esposti anche durante l'infanzia, l'adolescenza e la vita adulta a condizioni ambientali avverse, non può essere sostenuta (Frankel et al., 1996; Rich-Edwards et al., 1997; Leon et al., 1998).

E' stata dimostrata a questo proposito l'indipendenza della suddetta associazione dall'influenza dello stato socio-economico e dall'influenza del fumo di sigaretta, tuttavia, è stato osservato che lo stile di vita degli adulti si aggiunge agli effetti del peso alla nascita (Barker et al., 2002b); ad esempio, la prevalenza del diabete di tipo 2 è risultata essere più alta nelle persone che avevano un basso peso alla nascita e che sono diventate obese da adulte (Hales et al., 1991; McCance et al., 1994; Lithell et al., 1996; Rich-Edwards et al., 1999; Forsén et al., 2000).

L'unico studio trasversale, che ha avuto come obiettivo l'indagine della relazione tra diminuito apporto nutrizionale in gravidanza e insorgenza di malattie coronariche nella prole in età adulta e che ha portato risultati contrastanti con quelli ottenuti dalle tante ricerche analoghe effettuate sulla popolazione olandese, ha preso in esame soggetti che avevano vissuto l'assedio di Leningrado da parte delle truppe tedesche nel corso della Seconda guerra mondiale, dal settembre del 1941 al gennaio del 1944, con conseguente riduzione delle forniture alimentari fino a circa 300 calorie al giorno senza proteine, ancora più basse rispetto a quelle dell'inverno di fame olandese (Stein et al., 1975). La situazione peggiore si verificò nell'inverno del '41, poi il lago Ladoga ghiacciò in misura sufficiente da consentire il trasporto degli approvvigionamenti, consentendo un miglioramento delle forniture alimentari nella primavera del '42; in questo periodo il peso medio alla nascita era diminuito del 18% per i maschi e del 16% per le femmine (Antonov, 1947; Pavlov, 1965). Lo studio ha preso in considerazione tre gruppi: quello dei soggetti che erano stati esposti all'assedio in utero (n=37), quello dei soggetti che erano stati esposti nella prima infanzia fino ad un anno di età (n=62) e quello di soggetti non esposti (n=50) (Stanner et al., 1997); i risultati hanno mostrato che non c'era correlazione tra l'esposizione in utero alla malnutrizione materna e l'insorgenza di intolleranza al glucosio, dislipidemia, ipertensione o malattie cardiovascolari in età adulta, anche se è stato rilevato un aumento del fattore di von Willebrand, un marker di danno endoteliale, nel gruppo dei soggetti esposti in utero e una correlazione più forte nello stesso gruppo tra aumento della pressione sanguigna e obesità rispetto a quanto osservato per i soggetti appartenenti agli altri due gruppi, in accordo con l'ipotesi secondo cui la pressione sanguigna in età adulta sarebbe maggiormente influenzata dall'obesità nei soggetti che hanno subito un ritardo di crescita intrauterino (Leon et al; 1996). Gli autori stessi, comunque, hanno sottolineato il basso numero di soggetti studiati, soprattutto a causa delle numerose perdite al follow-up, la mancanza di dati affidabili sul peso alla nascita, in quanto il 22% dei soggetti ha fornito un peso ricordato e non registrato, e il fatto che entrambi i gruppi esposti avevano sofferto la fame durante la prima infanzia (Stanner et al., 1997; Rich-Edwards e Gillman, 1997).

Come ho già accennato, anche dagli studi sull'inverno di fame in Olanda sono arrivati risultati contrastanti: Roseboom e collaboratori, ad esempio, hanno concluso che aver sofferto

la fame nel periodo centrale o alla fine della gravidanza non ha comportato un aumento del rischio di dislipidemie (Roseboom et al., 2000), né di malattie cardiovascolari in età adulta (Roseboom et al., 2000), mentre questi effetti sono stati osservati se il feto era stato esposto alla carenza nutrizionale nel periodo iniziale della gestazione; Bygren e collaboratori non hanno riscontrato alcun aumento della mortalità (tra 40 e 70 anni) nei soggetti che erano stati esposti durante tutto il periodo della gestazione, bensì nei soggetti esposti solo all'inizio o solo alla fine della gestazione hanno rilevato un aumento della probabilità di morire di ictus (Bygren et al., 2000).

Kannisto e collaboratori, invece, nei loro studi su coorti finlandesi nate intorno al periodo di fame del 1866-1868, hanno concluso che aver sofferto la fame in utero o nella prima infanzia non era correlato ad un aumento della mortalità nella vita adulta (tra 17 e 80 anni) (Kannisto et al., 1997).

Uno studio prospettico di coorte più recente ha preso in esame il rischio di insorgenza di cardiopatia ischemica e la mortalità per ictus a lungo termine, fino al dicembre del 1999, dopo la grave inedia subita durante l'assedio di Leningrado, ma sono stati studiati solo uomini che avevano vissuto quel periodo durante la loro infanzia, adolescenza e prima giovinezza (di età compresa tra i 6 e i 28 anni), non nel periodo fetale. I risultati hanno rilevato un aumento della pressione, sia sistolica che diastolica, che persisteva anche tre decenni dopo l'evento, e un aumento della mortalità per cardiopatia ischemica e ictus; in particolare, è stato osservato che aver sofferto la fame nel periodo della pubertà (tra i 9 e i 15 anni) ha portato a maggiori associazioni con l'innalzamento della pressione sanguigna sistolica e con la morte per ictus in età adulta, rispetto all'aver sofferto la fame in altre epoche (Sparén et al., 2004). Questo studio ha portato, quindi, evidenze del fatto che anche la pubertà, così come il periodo fetale, può essere un momento fortemente vulnerabile dello sviluppo, anche se gli autori stessi hanno sottolineato l'impossibilità di scindere gli effetti della componente nutrizionale della fame dagli effetti dello stress conseguente al trauma dell'assedio.

Tutte queste considerazioni hanno spinto i ricercatori verso la necessità di una migliore comprensione sia dei periodi dello sviluppo intrauterino e post-nascita in cui la carenza

nutrizionale può influenzare lo stato di salute in età adulta, sia dei meccanismi attraverso cui tale influenza si realizza.

## EPIGENETICA NELLA VITA ADULTA

L'assetto dell'epigenotipo non è esclusivamente dipendente dalle modificazioni epigenetiche che possono avvenire nelle prime fasi della vita, ma è anche il risultato delle esperienze della vita adulta.

Queste evidenze sono fornite da studi su gemelli monozigoti, dotati quindi dello stesso patrimonio genetico; una delle prime ricerche ha interessato una coppia di gemelli monozigoti discordanti per una rara malattia (Oates et al., 2006), segnalata per la prima volta nel 1993 e successivamente nel 2002, definita “anomala duplicazione caudale” (OMIM 607864); questa consiste in una duplicazione della parte distale della spina dorsale (da L4) con duplicazione anche degli organi della cavità pelvica, quali colon, vescica, utero, vagina, e tumori e spina bifida. L'analisi genetica non presentava mutazioni nelle sequenze del DNA, ma la presenza di una metilazione molto più elevata nel gemello malato, a livello di una regione del promotore del gene *AXIN1*, che codifica per un inibitore della via di segnalazione intracellulare Wnt, che nell'animale è dimostrato causi la duplicazione della spina dorsale. Quindi, l'ipermetilazione del promotore di un gene inibitore causa l'attivazione di una via di segnalazione che porta alla duplicazione anomala della parte distale della spina dorsale.

Inoltre, uno studio del Laboratorio di Epigenetica dell'Istituto Nazionale di Ricerca sul Cancro, in Spagna, ha preso in esame 80 coppie di gemelli, maschi e femmine, con età comprese tra i 3 e i 74 anni ed età media di circa 30 anni. In un terzo delle coppie sono state riscontrate differenze epigenetiche significative; inoltre è stato osservato che queste discordanze aumentavano all'aumentare dell'età dei gemelli e con la diversificazione delle abitudini e degli ambienti di vita (Fraga et al., 2005). Quindi, oltre ad aver dimostrato come la programmazione epigenetica sia in grado di influenzare la vita di ogni individuo, ad esempio nei suoi aspetti di salute e malattia, come mostrerò ancora più specificatamente in seguito, è stato dimostrato anche che, viceversa, il comportamento umano è in grado di influire sulla programmazione epigenetica, portando alla conclusione che la relazione tra epigenoma e comportamento è di tipo bilaterale (McGowan et al., 2008).

Queste considerazioni conducono verso la possibilità di adozione di abitudini comportamentali capaci di influire positivamente sull'epigenoma, quali, ad esempio, alimentazione, attività fisica, gestione dello stress.

### *Il ruolo dell'alimentazione*

Il processo di metilazione del DNA richiede l'apporto nella dieta di molecole donatrici di metili, che entrano poi nei vari cicli metabolici sotto il controllo di fattori di modulazione ormonali; questo implica che l'alimentazione condiziona indirettamente e fortemente i processi epigenetici modulati dalla metilazione del DNA. I gruppi metile necessari per le reazioni di metilazione derivano, come ho detto, da molecole donatrici provenienti dalla dieta, ma anche da cofattori vitaminici (vitamina B6 e B12); il ciclo metabolico della metionina è il centro di convergenza di queste vie metaboliche. La metionina è convertita a S-adenosilmetionina (SAM), che è l'effettiva molecola donatrice di metili; la SAM, in seguito alla perdita del metile, viene convertita in S-adenosilomocisteina (SAH) e, successivamente, a omocisteina, che può seguire la via catabolica o essere nuovamente rimetilata a metionina; da notare che l'apporto di omocisteina nell'organismo è esclusivamente di origine metabolica, ed è, quindi, conseguente all'assunzione di metionina. Ne deriva il ruolo essenziale del ciclo biochimico della SAM e dell'omocisteina nell'attività degli enzimi metiltransferasi; la concentrazione di questi substrati, infatti, condiziona il mantenimento dei marcatori molecolari nei processi epigenetici, come è stato dimostrato, ad esempio, in soggetti affetti da iperomocisteinemia e uremia, nei quali si è osservata una riduzione della metilazione nei linfociti periferici (Ingrosso et al., 2003). Altri studi hanno mostrato come una dieta ricca di metionina, presente soprattutto in carne e formaggi, possa produrre un'ipermetilazione di alcune aree cerebrali, portando ad un aggravamento della schizofrenia o delle psicosi; al contrario i broccoli, ad esempio, sulla base di esperimenti condotti su animali, sembrano essere efficaci nel contrastare l'ipermetilazione, in quanto contengono inibitori naturali della deacetilazione, risultando utili nei sopracitati disturbi psichiatrici, ma anche nell'autismo, nel Parkinson e nell'Alzheimer (Dauncey, 2013). Una dieta che induca una maggior sintesi endogena di S-adenosil-metionina, invece, può essere efficace nel

contrastare la depressione unipolare (McGowan et al., 2008). Inoltre, è ormai ampiamente dimostrato che una dieta eccessiva, sia come quantità di calorie, sia come presenza di zuccheri raffinati e di determinati tipi di grassi (acidi grassi saturi), oltre ad essere povera di vitamine e minerali, causi l'attivazione del fattore nucleare NF-kB, che, come già descritto, è la via principale di segnalazione intracellulare per l'attivazione di centinaia di geni deputati alla produzione di sostanze relative alla proliferazione cellulare e all'infiammazione (Alam et al., 2012). Al contrario, alcune sostanze, tra cui il resveratrolo, la curcumina, il butirrato e gli acidi grassi polinsaturi a catena corta, sono capaci di contrastare la marcatura epigenetica in senso infiammatorio, attraverso la deacetilazione delle code istoniche; in numerose prove sperimentali effettuate sui topi è stato dimostrato che la restrizione calorica e/o l'incremento dell'assunzione di omega-3 (attraverso una dieta a base di olio di pesce) porta ad un incremento di oltre il 30% del tempo di vita, rispetto al gruppo di topi che veniva alimentato con olio di mais e senza restrizioni caloriche; si è osservato, inoltre, che l'aumento della sopravvivenza era associato ad una concentrazione più bassa di NF-kB e ad una concentrazione più alta dei principali enzimi antiossidanti (superossidodismutasi, catalasi e glutazione perossidasi (Alam et al., 2012).

Inoltre, sostanze naturali, come l'epigallocatechina 3-gallato (polifenolo estratto dal tè verde), il resveratrolo (fenolo presente nella buccia dell'uva rossa) e la curcumina, sono in grado di diminuire l'attivazione degli enzimi DNA-metiltransferasi; potrebbero, quindi, contribuire alla prevenzione del cancro, in quanto è stata osservata un'implicazione degli enzimi metilanti nella cancerogenesi (Jones, 2002; Mirza et al., 2013). Altri recenti studi sperimentali sul resveratrolo, infatti, hanno dimostrato che potrebbe essere impiegato nella prevenzione del cancro al seno proprio in virtù della sua azione epigenetica (Papoutsis et al., 2013).

La prima evidenza per cui determinate carenze nutrizionali sono risultate induttrici di processi tumorali risale al 1946, quando Copeland e Salmon nei loro esperimenti alimentarono topi in assenza di colina e in carenza di metionina e acido Folico, dimostrando un'induzione tumorale dovuta alla carenza di sostanze donatrici di metili (Copeland e Salmon, 1946); evidenza confermata successivamente da studi di altri ricercatori (Mikol et al., 1983; Newberne, 1986). Inoltre è stato dimostrato che il deficit di anche uno solo dei tre



nutrienti è in grado di perturbare il metabolismo degli altri due, a causa dell'interdipendenza metabolica tra metionina, colina e folati (Krumdieck, 1983), portando ad un'importante deplezione di folati, fondamentali per la sintesi degli acidi nucleici e, quindi, causa di instabilità genomica, che può agire come fattore inducente nel processo di cancerogenesi (James et al., 2003). Come esposto in precedenza, anche gli studi di Morgan del 1999 dimostrarono, nel topo, l'importanza dell'integrazione nella dieta di molecole donatrici di metili, quali acido Folico, vitamina B12, colina e betaina, in relazione a patologie quali diabete, obesità e tumori (Morgan et al., 1999). Anche la genisteina, il fitoestrogeno prevalente nella soia, conduce ad un ipermetilazione e questo effetto è stato messo in relazione sia con una protezione dall'insorgenza dell'obesità (Dolinoy, 2006), sia con la bassa incidenza di tumori mammari e prostatici nelle popolazioni asiatiche, che la assumono abitualmente nella dieta (Lee et al., 1991; Lamartiniere et al., 2002).

Anche se in minor misura, sono presenti in letteratura studi relativi a molecole di origine vegetale capaci di condizionare l'acetilazione istonica. Tra queste c'è il già citato resveratrolo, che, nei modelli biologici studiati, ha determinato un aumento della longevità nel lievito attraverso un meccanismo di attivazione dell'enzima Sirtuina-deacetilasi (SIR2) (Howitz et al., 2003; Wood et al., 2004); il sulforafano, isolato dai broccoli, inibisce l'enzima Istone-deacetilasi sia in linee tumorali umane del colon, sia in varie linee cellulari prostatiche; questa inibizione è accompagnata nelle linee cellulari prostatiche da un incremento dell'acetilazione istonica variabile dal 50 al 100%, il quale comporta un arresto della crescita cellulare e l'attivazione dei processi apoptotici (Myzak et al., 2006). La diidrocumarina, estratta dal meliloto (*Melilotus officinalis*) e abitualmente impiegata come additivo negli alimenti e nei cosmetici, è invece un inibitore dell'enzima Sirtuina-deacetilasi umana (SIRT1) (Olaharski et al., 2005); le SIRT1 agiscono come deacetilasi dell'antioncogene p53 e di altre proteine coinvolte nell'attivazione dei processi apoptotici (Luo et al., 2001; van der Horst et al., 2004).

### *Il ruolo dell'attività fisica*

Gli studi che documentano gli effetti positivi di un'attività fisica regolare sull'organismo umano, sia dal punto di vista della prevenzione che dal punto di vista terapeutico, sono moltissimi; ad oggi, sono invece ancora pochi gli studi che documentano una relazione tra attività fisica e modificazioni epigenetiche.

Tra questi merita citare uno studio giapponese, che è stato realizzato su tre gruppi: un gruppo di giovani, uno di anziani e un gruppo di controllo composto da anziani che non svolgono attività fisica regolare; i primi due gruppi sono stati sottoposti per sei mesi a quella che sembra essere la miglior forma di attività fisica, ovvero quella aerobica alternata: nello specifico, tre minuti di camminata a passo svelto e tre minuti di corsa, in modo da raggiungere circa il 70% della capacità aerobica di ogni soggetto. E' stato studiato il gene ASC, che codifica per due citochine coinvolte nella risposta infiammatoria, IL-1beta e IL-18. I risultati hanno mostrato una metilazione del gene superiore nel gruppo dei giovani rispetto al gruppo di anziani sottoposti al regime di attività fisica aerobica alternata, a dimostrazione del fatto che con l'aumentare dell'età diventa più difficile tenere sotto controllo i geni coinvolti nei processi infiammatori; ancora più rilevante è il fatto che la metilazione del gene ASC nel gruppo di anziani praticanti attività fisica è risultata statisticamente superiore a quella osservata nel gruppo di anziani sedentari (Nakajima et al., 2010). Quindi la pratica di un'attività fisica regolare sembra poter garantire una minor perdita della metilazione correlata all'età del soggetto, consentendo un maggior controllo di un gene fondamentale nella produzione di citochine infiammatorie; questo può avere importanti conseguenze sulla salute, in quanto, come è noto, il problema principale dell'invecchiamento è proprio lo scarso controllo dei processi infiammatori (Cevenini et al., 2012).

### *Il ruolo dello stress nella vita adulta*

Come ho introdotto nel capitolo precedente, lo stress è un fenomeno connaturato alla vita dell'essere umano, ed è il cervello che stabilisce ciò che è minaccioso per ciascun individuo e

che promuove le risposte fisiologiche e i comportamenti adeguati e adattativi alla condizione stressante (McEwen et al., 2012).

In letteratura sono ormai presenti molti studi che hanno documentato come lo stress cronico sia capace di modulare nell'adulto diverse aree cerebrali fondamentali, quali i circuiti emozionali, cognitivi e della memoria: ad esempio, può indurre modificazioni strutturali nell'ippocampo, causandone atrofia con problemi di memorizzazione per l'individuo, oppure nell'amigdala, causandone ipertrofia con conseguente ansia e iper-reattività emotiva.

La ricerca epigenetica degli ultimi anni ha iniziato a portare evidenze dell'esistenza di una relazione tra stress acuto o cronico e modificazioni epigenetiche: oltre a modifiche strutturali a lungo termine, che comunque possono essere in qualche misura reversibili se cessano le condizioni stressanti che le hanno generate, il cervello risponde in modo flessibile agli eventi della vita, attraverso le marcature epigenetiche. Ne è un esempio proprio il processo di memorizzazione, che viene considerato una condizione di stress cerebrale fisiologico, dal momento che porta ad un aumento delle concentrazioni di cortisolo, glutammato, noradrenalina, ovvero degli ormoni e dei neurotrasmettitori dello stress; durante la memorizzazione, centrata nell'ippocampo, si osservano in quest'area cerebrale numerosi meccanismi di acetilazione degli istoni e di metilazione-demetilazione; il mantenimento a lungo termine della traccia mnestica, invece, sembra affidato ad un processo stabile di metilazione (Sweatt et al., 2009).

Nell'animale uno stress acuto (immobilizzazione) ha indotto il raddoppio della metilazione delle code istoniche H<sub>3</sub> dei geni del giro dentato (Hunter et al., 2009); un altro esempio è fornito da un modello sperimentale che mima la "sconfitta sociale", in cui si è osservato un aumento dell'attività dell'enzima DNA-metiltransferasi nel nucleo accumbens (LaPlant, 2010), area cerebrale che produce dopamina e che attiva il circuito del premio; gli animali che hanno metilati i geni dei neuroni di questa area sono, quindi, tristi, al contrario di quelli che hanno un aumento dell'acetilazione dei geni dell'ossitocina e della vasopressina (ormoni della socialità e del legame affettivo) in seguito ad un rapporto sessuale (Wang et al., 2013). In un altro modello di sconfitta sociale, sono stati osservati segni di metilazione a livello del promotore del gene BDNF, fattore nervoso che svolge anche un'attività antidepressiva (Tsankova et al., 2006); a livello delle isole CpG del promotore del CRH

(ormone ipotalamico che attiva la risposta di stress, inducendo il rilascio della corticotropina) si osserva, invece, una demetilazione, che comporta un'iperattivazione dell'espressione genica, portando ad un'iperattività dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene (HPA) e quindi dello stress (Elliott et al., 2010); inoltre, trattando l'animale socialmente sconfitto con un inibitore dell'enzima metiltransferasi direttamente nel nucleo accumbens, esso ritorna ad un comportamento normale, e mostra sollievo se trattato con l'antidepressivo fluoxetina, con parziali modificazioni della marcatura epigenetica.

Queste osservazioni ci portano tra l'altro verso un aspetto fondamentale della marcatura epigenetica, che è quello della reversibilità, ottenibile sia con trattamenti farmacologici, che con abitudini comportamentali adeguate. Nella fattispecie, imparando a gestire lo stress; a tal proposito sono ancora pochi gli studi presenti in letteratura, ma quelli pubblicati dimostrano che tecniche di gestione dello stress, come la meditazione, lo Yoga, il Tai chi, hanno effetti sull'espressione genica (Kaliman, 2014).

Riassumendo, una condizione di stress che dura nel tempo può indurre a livello cerebrale una marcatura epigenetica stabile, in grado di modificare l'attività dell'asse dello stress e dei circuiti neuroendocrini immunitari ad esso collegati. Come mostrerò nel capitolo successivo, questa segnatura può passare nei gameti ed essere, quindi, trasmessa alla prole, che avrà la stessa configurazione dell'asse dello stress dei genitori (Rodgers et al., 2013).

### *Il ruolo degli “Interferenti Endocrini” (IE)*

Con il termine “*Interferenti Endocrini*” (IE) l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha definito tutte quelle sostanze esogene che alterano le funzioni del sistema endocrino, provocando conseguentemente effetti negativi sulla salute in un organismo intatto, o nella sua progenie o in (sotto) popolazioni (WHO, 2012). Queste sostanze possono esplicare i loro effetti sia attraverso un'azione tossica diretta, capace di produrre un danno a cellule e tessuti, sia attraverso un'azione indiretta e persistente nel tempo, capace di colpire il sistema neuroendocrino e il sistema immunitario.

Tra questi abbiamo pesticidi, detersivi (presenti ad esempio in vernici e saponi), ftalati (presenti nei cateteri, nelle tettarelle e nei cosmetici), sostanze plastiche (tra cui il Bisfenolo

A, che ricopre l'interno dei barattoli di latta), diossine, sostanze di scarico degli inceneritori, idrocarburi aromatici (emessi dallo scarico delle auto), ed altri (Bologna, 2012).

L'evoluzione del rischio chimico ha attraversato varie fasi dall'inizio della rivoluzione industriale fino ad oggi: si è passati da una situazione di elevato impatto, dove la contaminazione chimica causava situazioni di vera e propria emergenza sanitaria, soprattutto per la totale mancanza di presidi di protezione e di contenimento, sia da un punto di vista tecnico che normativo, ad una situazione, quella delle attuali società tecnologicamente avanzate, in cui la contaminazione è subacuta, per la riduzione delle concentrazioni di contaminanti, ma generalizzata, in quanto ubiquitaria.

Sono ormai moltissimi gli studi presenti in letteratura (sia caso-controllo che di coorte) che hanno dimostrato la relazione tra contaminazione chimica ed eziopatogenesi del cancro; inoltre, ci sono numerose evidenze epidemiologiche allarmanti per la salute umana associabili alla diffusione degli interferenti endocrini: l'incidenza di patologie neoplastiche alla mammella, alla prostata, al testicolo e ad altre parti dell'apparato riproduttivo; la diminuzione della concentrazione e della motilità degli spermatozoi nel liquido seminale; la mancata discesa dei testicoli; le malformazioni al pene e la riduzione della dimensione degli organi genitali maschili (Berkowitz et al., 1993; Forman et al., 1994); è poi di recentissima pubblicazione una review di tutti gli studi in vivo ad oggi pubblicati che sostengono il ruolo degli EDC nell'obesità (Stel e Legler, 2015).

Fino alla fine del XX secolo, la ricerca sui possibili meccanismi responsabili dell'azione tossica degli *interferenti endocrini* si era focalizzata sulla loro capacità di mimare l'azione degli ormoni per agonismo competitivo, o sulla loro capacità di contrastarne il legame ai recettori cellulari per antagonismo competitivo.

Studi successivi hanno dimostrato, per molte di queste sostanze, che la loro azione tossica si esplica attraverso meccanismi epigenetici e, oltretutto, gli studi sugli *interferenti endocrini* hanno permesso sia di dare ulteriori conferme all'ipotesi di Barker, sia, come spiegherò nel dettaglio nel prossimo capitolo, di conoscere gli effetti transgenerazionali delle modificazioni epigenetiche.

Come esempio, riporto il meccanismo di azione epigenetico degli EDC nello stimolare in modo inappropriato l'adipogenesi e il deposito di grasso, nell'influenzare il metabolismo e

l'equilibrio energetico e nell'incrementare, quindi, la suscettibilità all'obesità, considerando l'importanza che riveste oggi questa patologia in costante aumento (quasi raddoppiata dal 1980 ad oggi) e i rischi a cui predispone, quali diabete e malattie cardiovascolari (WHO, 2014). Diversi studi condotti sugli animali in questi ultimi anni hanno dimostrato che l'esposizione prenatale (Herbstman et al., 2012; Yan et al., 2014) e nelle fasi iniziali della vita ad alcuni EDC influenza la programmazione epigenetica associata all'obesità nella vita adulta (Kirchner et al., 2010; Bastos Sales et al., 2013; Mannikkam et al., 2013; Skinner et al., 2013; Strakovsky et al., 2013; Kamstra et al., 2014; Manikkam et al., 2014; Yan et al., 2014; Strakovsky et al., 2015). E' stato osservato che questo avviene grazie alla loro capacità di legare i recettori nucleari e altri fattori di trascrizione; i recettori nucleari, come i recettori steroidei, sono una famiglia di fattori di trascrizione che, in seguito all'attivazione da parte di uno o più ligandi, possono reclutare enzimi, quali metil- e acetiltransferasi, che modificano i segnali epigenetici che regolano l'espressione dei geni bersaglio (Ozgin et al., 2015). Gli EDC, quindi, sono in grado di attivare o di inibire i recettori nucleari e altri fattori di trascrizione, modificando gli stati della cromatina, così come l'espressione dei modulatori, come DNA- e Istone-metiltransferasi (Rissman e Adli, 2014).

Il recettore dei proliferatori di perossisomi gamma (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*, PPARgamma) è un importante recettore nucleare coinvolto nella regolazione dei geni metabolici durante la differenziazione ed è considerato il principale regolatore dell'adipogenesi, in quanto attiva molti geni preposti all'ossidazione dei lipidi, promuove la gluconeogenesi e reprime i geni del catabolismo degli amminoacidi (Janesick e Blumberg, 2011); EDC, quali TBT, BDE-47, IPA, agiscono come ligandi per il recettore PPARgamma, causando un'ipermetilazione del recettore stesso o dei suoi geni bersaglio, con conseguenti effetti obesogenici (Bastos Sales et al., 2013).

Il recettore per gli estrogeni (ERalfa) è un altro importante fattore trascrizionale associato alla comparsa di obesità latente (Janesick e Blumberg, 2012); altri EDC, quali BPA e genisteina, infatti, sono in grado di attivare il recettore ERalfa (Ozgin et al., 2015; Li et al., 2013) e di indurre la trascrizione della regione promotrice del recettore stesso (Doshi et al., 2011; Jefferson et al., 2002) attraverso la sua ipermetilazione.

Si può riassumere quanto fin qui esposto con le parole di Michael Meaney:

“L’epigenoma del feto in sviluppo è particolarmente sensibile alla nutrizione materna e all’esposizione a tossine ambientali così come allo stress psicologico. Noi concludiamo che non solo l’esposizione del cucciolo a sostanze chimiche ma anche all’ambiente sociale e alle cure materne può influenzare l’epigenoma” (Szyf et al., 2007, p. 15).

## EREDITARIETA' EPIGENETICA TRANSGENERAZIONALE

### *I meccanismi dell'ereditarietà epigenetica transgenerazionale*

Come è emerso più volte nel corso dei capitoli precedenti, le marcature epigenetiche possono essere trasmesse alla prole essenzialmente in due modi:

- per via germinale, attraverso l'alterazione diretta dell'epigenoma delle gonadi.
- nel corso della gestazione o nelle prime fasi della vita, in base alle condizioni di sviluppo in utero e alle cure parentali dopo la nascita.

Il meccanismo prevalente che sottende a questo tipo di ereditarietà, come già accennato, è la metilazione del DNA, ma l'osservazione che in *Drosophila*, seppure sia ormai appurata la presenza di effetti transgenerazionali, le sequenze CpG metilate sono in numero così ridotto da far dubitare della loro rilevanza ai fini dell'ereditarietà epigenetica (Lyko et al., 2000), ed il fatto che in questo insetto non è ancora stata accertata la presenza di DNA-metiltransferasi (Goll et al., 2006), ha portato la ricerca a studiare possibili meccanismi alternativi alla metilazione del DNA, che potessero spiegare comunque le evidenze degli effetti transgenerazionali in diversi modelli animali, tra cui i microRNA e l'acetilazione e la metilazione istonica (Ooi e Henikoff, 2006). In particolare, sono stati identificati dei marker di repressione realizzati attraverso la metilazione istonica nei cosiddetti complessi *Polycomb Group* (PcG) o nei *Tritorax Group* (TrxG), presenti nel DNA di topo, ma trovati per la prima volta in *Drosophila* (Blewitt et al., 2006); i geni PcG mantengono silente l'espressione dei geni che coordinano lo sviluppo embrionale, mentre i geni TrxG sono deputati al mantenimento dei domini spaziali delle strutture embrionali; il meccanismo con cui le proteine PcG svolgono la loro azione non è completamente noto, ma è altamente probabile che la metilazione istonica abbia un ruolo predominante; le proteine TrxG sembra che contrastino la funzione repressiva delle PcG attraverso la metilazione di un residuo di lisina sull'istone 3 (Muller e Kassis, 2006). Successivamente Ruden e Lu ipotizzarono che la persistenza transgenerazionale del segnale epigenetico fosse associata alla metilazione della cromatina proprio attraverso questo complesso sistema di regolazione (Ruden e Lu, 2008); il



modello proposto da questi ricercatori, quindi, non coinvolgeva le DNA-metiltransferasi, pressoché assenti in *Drosophila*, ma integrava il ruolo delle chaperonine, che, come ho già spiegato, agiscono come sensori degli stati di stress; in particolare, sono state scoperte due chaperonine che interagiscono con Hsp90, la cui attività garantisce l'ottimizzazione dell'attività enzimatica della H<sub>3</sub> Lisina-4-metiltransferasi promuovendo la trascrizione (Zhao et al., 2005).

Il complesso meccanismo epigenetico descritto per la *Drosophila* implica anche una rimodulazione temporale dei processi evolutivi nell'ottica di un'evoluzione morfologica a breve termine. Infatti l'eredità epigenetica transgenerazionale sposta la finestra temporale dell'evoluzione dalle centinaia o migliaia di anni della tradizionale teoria evoluzionistica, proposta da Darwin e dal Neo-Darwinismo, a tempi propri dell'ambito transgenerazionale, ovvero a breve termine, come dimostrano i risultati di studi condotti da Shire e collaboratori dagli anni '60 in poi sulla modulazione ormonale che accompagna il processo di addomesticamento delle volpi argentate (Shire, 1976; Trut, 1989; Trut et al., 2004) e recenti ricerche svolte sui cani domestici (Douglas et al., 2008; Sutter e Ostrander, 2004). Fondon e Garner, in particolare, hanno mostrato che la causa principale della rapida evoluzione morfologica nei cani è l'espansione o la contrazione di sequenze genomiche ripetute in tandem nei geni preposti allo sviluppo (due o più nucleotidi ripetuti in sequenze adiacenti, come le CAGn) (Fondon e Garner, 2004); studi successivi hanno confermato l'associazione con la lunghezza di sequenze ripetute, associandola, tra l'altro, ad alterazioni neurologiche (Lohi et al., 2005). E' stato osservato che la grande peculiarità dell'espansione o della contrazione di sequenze ripetute è il fatto che si manifestano con una velocità circa 100.000 volte superiore a quella delle mutazioni puntiformi (Ellegren, 2004). Inoltre, Ruden e collaboratori hanno ipotizzato che l'alterazione dei segnali ormonali nelle volpi sia trasmessa alle generazioni successive tramite un'alterazione epigenetica, che insorgerebbe a livello della linea germinale come conseguenza dello stress cellulare e sarebbe mediata dal sistema neuroendocrino (Ruden et al., 2008), lasciando emergere una nuova teoria dell'evoluzione orientata verso la causalità e non verso la casualità. Infatti, in seguito alle osservazioni che le mutazioni a carico della DNA-metiltransferasi o il blocco della sua attività con 5-Azacitidina (che provocano ipometilazione) determinano instabilità nelle sequenze ripetute, e

all'osservazione che il blocco della Hsp90 induce modificazione della cromatina e alterazioni morfologiche, nel suo modello Ruden ha ipotizzato che la perdita o la riduzione dell'attività di Hsp90, causata dallo stress, comporti ipometilazione delle sequenze ripetute, instabilità genomica e conseguente espansione o contrazione delle sequenze ripetute; quindi, l'inattivazione o l'iperattivazione dei geni coinvolti nello sviluppo, dovuta alla variazione di lunghezza delle sequenze, sarebbero responsabili delle varianti morfologiche osservate anche nei cani; la rimozione della condizione di stress comporterebbe, poi, la rimetilazione delle citosine e il consolidamento della lunghezza delle sequenze ripetute e, conseguentemente, della nuova morfologia (Ruden et al., 2008). Gli autori hanno poi riportato molte evidenze sperimentali a sostegno della loro teoria, sottolineando il fatto che lo stress è anche una condizione tipica della fase embrionale, in quanto la gestazione è caratterizzata da una richiesta di *stress ossidativo* fisiologica.

Dunque, accanto alla tradizionale mutazione genica, casuale e rara, e alla selezione a livello di popolazione, dovrebbe essere considerata una terza componente, ovvero la riprogrammazione durante lo sviluppo prenatale (Arthur, 2004).

E' importante sottolineare che per molte patologie, quali cancro, patologie autoimmuni ed endocrine, sindrome metabolica, depressione e disturbo bipolare, non è sempre possibile identificare un'associazione diretta di causa-effetto, ma si possono solo qualificare i fattori di rischio che concorrono a definire una probabilità di incidenza. E' nota la predisposizione familiare delle patologie elencate, ma la loro eziologia solo raramente è riconducibile ad una trasmissione genetica mendeliana (Kaati et al., 2007); inoltre, in linea con quanto osservato negli animali, la selezione di polimorfismi predisponenti è inquadrabile in dinamiche temporali che non possono essere ricondotte ai tempi degli effetti transgenerazionali osservati, osservazione che porta a considerare la rilevanza dei processi epigenetici e la loro correlazione con l'ambiente di vita (Randy e Skinner, 2007).

### *Gli studi sugli animali*

Di grande rilievo sono gli esperimenti condotti presso il Center for Reproductive Biology della Washington State University e diretti da Michael Skinner. I ricercatori hanno sottoposto

gli animali all'esposizione del fungicida "vinclozolina", un *interferente endocrino*, nel momento della loro determinazione sessuale gonadica: i risultati hanno mostrato che più del 90% dei maschi di tutte le generazioni successive analizzate fino alla quarta (F1-F4) avevano una ridotta capacità spermatica (Anway et al., 2005), dimostrando, quindi, un effetto transgenerazionale sulla fertilità maschile e sulla funzione testicolare.

Lo stesso gruppo di animali è stato studiato a distanza di un anno e questo ha permesso di rilevare la comparsa, nelle stesse generazioni, di varie altre malattie, quali tumori e malattie della prostata e del rene (Anway et al., 2006); dal momento che la prevalenza di queste malattie negli animali studiati era molto alta (dal 20 al 50%), i ricercatori dedussero che essa non poteva essere attribuita a mutazioni nella sequenza del DNA, in quanto queste generalmente si presentano con una frequenza inferiore allo 0,01%. Come spiegazione del fenomeno osservato ipotizzarono un meccanismo epigenetico che coinvolgeva la metilazione del DNA della linea germinale; questa ipotesi è stata effettivamente confermata dall'analisi delle alterazioni nella metilazione di geni e sequenze del DNA di derivazione paterna, che risultano associate alle malattie riscontrate (Chang et al., 2006).

Successivamente gli stessi ricercatori, insieme ad un gruppo del dipartimento di Integrative Biology e di Psicologia dell'Università del Texas, hanno osservato che femmine di ratto, non esposte da tre generazioni al fungicida, evitavano di accoppiarsi con maschi esposti, concludendo che l'ereditarietà epigenetica transgenerazionale, prodotta dall'azione di una sostanza chimica interferente endocrina, rappresenta una forza di selezione sessuale finora trascurata, interpretando i risultati, quindi, come una diretta evidenza sperimentale del ruolo dell'epigenetica quale determinante fattore evolutivo (Crews et al., 2007).

Inoltre, studi ancora più recenti hanno dimostrato che tre generazioni dopo l'esposizione al pesticida i discendenti, sottoposti ad una condizione di stress, sono più ansiosi e meno socievoli rispetto agli animali non esposti e sottoposti alla stessa condizione di stress, e presentano alterazioni nell'amigdala, nell'ippocampo e a livello dei sistemi metabolici (Crews et al., 2012).

Negli stessi laboratori di ricerca sono stati effettuati studi anche su altri *interferenti endocrini* (DDT, metossicloro, BPA, DEHP, DBP), ed è stato osservato che essi sono in grado di indurre effetti transgenerazionali obesogenici; DDT e metossicloro, ad esempio, non hanno

provocato alcun effetto sul peso corporeo della generazione F1, che aveva subito un'esposizione prenatale, ma sono stati associati con la maggior incidenza di obesità rilevata nella generazione F3, che non aveva subito un'esposizione diretta; questo ha portato a ipotizzare che gli effetti sul peso corporeo in F3 fossero stati indotti da epimutazioni nella linea germinale introdotte in F1 (Skinner, 2014); l'ipotesi è stata confermata attraverso l'analisi della metilazione del genoma, che ha rilevato epimutazioni in differenti regioni metilate di geni che possono essere associati con l'obesogenesi (Skinner et al., 2013; Manikkam et al., 2014).

Un effetto simile è stato osservato esponendo gli animali ad una miscela di BPA, DEHP e DBP, i quali hanno provocato gli stessi effetti transgenerazionali per quanto riguarda obesità, malattie dell'apparato riproduttivo e alterazioni dello sperma (Manikkam et al., 2013).

Inoltre, è stato dimostrato che l'esposizione prenatale al TBT nel topo causa un effetto transgenerazionale che riguarda l'aumento dei depositi di grasso e l'insorgenza di steatosi epatica, attraverso l'alterazione dei profili di metilazione del DNA, ma forse anche attraverso altri processi epigenetici (Chamorro-García et al., 2013).

In letteratura è presente poi una serie di studi sull'animale che ha confermato una trasmissione epigenetica transgenerazionale influenzata da fattori alimentari e da condizioni di stress subite dai genitori o dai nonni in epoca puberale e adulta. Ad esempio, esperimenti effettuati sui topi hanno dimostrato che, se il maschio digiuna completamente per 24 ore alcuni giorni prima della fecondazione, la prole avrà livelli di glucosio eccessivamente ridotti e alterazioni nella produzione di corticosterone e Igf1 (fattore di crescita insulino-simile di tipo 1, fondamentale per la crescita e il metabolismo); inoltre, se il maschio ha subito una restrizione proteica nella sua fase prenatale, avrà una prole e dei nipoti con problemi di crescita (studi rivisti in: Mansuy, 2013).

Allo stesso modo è stato osservato che, se topi maschi in età puberale o adulta hanno subito una condizione di stress variabile per qualche settimana e, a distanza di due settimane, vengono fatti accoppiare, i loro figli e nipoti mostreranno una soppressione dell'asse dello stress di fronte a stimoli stressanti; nel cervello dei padri stressati è stata rilevata un'alterazione epigenetica dei geni dei neuroni del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, che producono CRH, il quale attiva l'asse dello stress; inoltre, lo studio del loro sperma ha

documentato la presenza di nove specifici microRNA con funzioni epigenetiche (Rodgers et al., 2013).

Infine, di notevole importanza per la sua rilevanza sociale e medica è uno studio che ha dimostrato la trasmissione del cosiddetto fenotipo asmatico da parte di topoline gravide esposte al fumo di sigaretta; le anomalie respiratorie che predispongono alla malattia asmatica sono state rintracciate fino alla terza generazione successiva a quella degli animali esposti al fumo di sigaretta (Rehan et al., 2013).

### *Gli studi sull'uomo*

Una delle prime ricerche effettuate sull'uomo ha dimostrato che gli uomini di Taiwan, masticando regolarmente i semi di una palma detti “noci di betel”, sono predisposti al diabete e trasmettono il rischio di ammalarsi di questa malattia alla progenie; questi risultati sono stati confermati da esperimenti su topi alimentati con gli stessi semi, dimostrando tra l'altro che l'alterazione epigenetica che li sottende viene trasmessa per via paterna (Chen e Boucher, 2006).

Inoltre, in un lavoro condotto da oncologi dell'Università di Sidney è stata rintracciata un'epimutazione su un gene appartenente al sistema di riparazione detto “mismatch repair”, *MLH1*, che predispone allo sviluppo del cancro, in particolare del colon-retto; studiando i figli delle persone con diagnosi di cancro e con la presenza della suddetta epimutazione, è stato osservato che l'epimutazione in due dei tre figli maschi era stata trasmessa dalla madre ma riportata allo stato normale, mentre nel terzo figlio l'ipermetilazione del gene *MLH1* era ancora rintracciabile a livello somatico, ma era stata eliminata a livello spermatico (Hitchins et al., 2007). Questi interessanti risultati sono stati pubblicati dal *New England Journal of Medicine* e commentati dagli editorialisti stessi, i quali hanno scritto che essi dimostrano la trasmissibilità dell'epimutazione, ma anche il fatto che esiste un meccanismo di cancellazione della marcatura nel momento della fecondazione, che, come ho spiegato nel capitolo precedente, è molto più efficiente nel gamete maschile che in quello femminile (Gosden e Feinberg, 2007). Già Morgan aveva osservato che la riprogrammazione epigenetica era, solitamente, più radicale nel gamete maschile e più lenta nel gamete

femminile (Morgan et al., 2005). Alla luce di queste osservazioni, Gosden e Feinberg pubblicarono le seguenti considerazioni:

“In aggiunta alla classica visione secondo cui la variazione genetica e l’ambiente influenzano il fenotipo, il modello epigenetico suggerisce che l’epigenotipo modula gli effetti genetici. L’epigenotipo, a sua volta, è influenzato dall’ambiente, dall’epigenotipo dei genitori, dall’età e dal genotipo nei loci che regolano la metilazione del DNA e della cromatina” (Gosden e Feinberg, 2007, p. 731).

Negli stessi anni sono stati pubblicati i risultati di uno studio che ha dimostrato una correlazione tra le abitudini alimentari dei nonni nel periodo di crescita lenta che precede la pubertà (Slow Growth Period) e il rischio di diabete e mortalità cardiovascolare nei nipoti; inoltre è stata ipotizzata una relazione sesso-specifica, in quanto è stato osservato che i nonni predicevano la longevità dei nipoti, mentre le nonne quella delle nipoti (Pembrey et al., 2006; Kaati et al., 2007). Tra l’altro già negli anni ’90 Pembrey aveva ipotizzato che i mediatori dell’effetto transgenerazionale potessero essere i geni sottoposti ad *imprinting* (Pembrey, 1996) e poco dopo venne scoperta l’associazione tra diabete di tipo 1 e di tipo 2 e *imprinting* paterno, dando una spiegazione in termini molecolari all’osservazione di Pembrey (Bennet et al., 1997; Ong et al., 1999), finché, qualche anno dopo, venne chiarito il meccanismo di azione della proteina CTCF (*CCCTC binding Factor*), che ha la funzione primaria di reprimere il gene *Igf2* (Ohlsson et al., 2001), contribuendo in maniera determinante alla comprensione della dinamica dell’*imprinting*. CTCF è espressa ubiquitariamente nelle cellule somatiche, dove è necessaria alla sopravvivenza, ma è assente nelle cellule germinali; questa osservazione portò i ricercatori ad ipotizzare l’esistenza di un fattore diverso nelle cellule germinali, ma con le stesse funzioni; fu così identificata la proteina BORIS (*Brother of the Regulator of Imprinted Sites*) (Loukinov et al., 2002; Klenova et al., 2002); questa “passa il controllo” alla proteina CTCF durante la gametogenesi, proprio durante la cancellazione e il ripristino della metilazione; sembra plausibile, quindi, che fattori nutrizionali, mediati dal metabolismo e dalle variazioni ormonali, possano condizionare questa transizione.

Di notevole rilievo sono anche i risultati di uno studio pubblicato quest’anno, che ha dimostrato per la prima volta il coinvolgimento dei meccanismi epigenetici nella trasmissione transgenerazionale degli effetti dello stress nell’uomo (Yehuda et al., 2015) sui sopravvissuti

all'Olocausto e sulla loro prole. I ricercatori hanno posto la loro attenzione sul co-chaperone FKBP5, un importante regolatore della GR-sensibilità (Binder, 2009), la cui alterazione era già stata associata sia con PTSD (*disturbo post-traumatico da stress*) che con effetti intergenerazionali (Daskalakis et al., 2013; Lehrner et al., 2014); FKBP5 è in grado di diminuire il legame dei glucocorticoidi al loro recettore, impedendo la traslocazione di GR al nucleo (Pratt e Toft, 1997; Wozniak et al., 2005). A sua volta, l'espressione genica di FKBP5 è regolata dal legame con GR, attraverso un meccanismo di feedback negativo intracellulare che regola sia FKBP5 che GR (Binder, 2009; Jaaskelainen et al., 2011); l'espressione genica di FKBP5 è risultata essere alterata in PTSD e nella depressione maggiore (Yehuda et al., 2009; Menke et al., 2013); inoltre, è stato dimostrato che i polimorfismi di FKBP5 (FKBP5 SNPs) interagiscono con il trauma precoce nel predire sia il PTSD che la depressione maggiore (Binder et al., 2008; Koenen e Uddin, 2010), probabilmente attraverso il coinvolgimento di alleli specifici, modificati dall'ambiente nella metilazione di specifici siti CpG (Klengel et al., 2013). Klengel e collaboratori hanno poi dimostrato che solo l'introne 7 sui siti CpG era diversamente metilato in seguito ad abuso precoce in presenza dell'allele di rischio FKBP5 rs1360780; in particolare, questi introni vengono demetilati dai glucocorticoidi, soprattutto in corrispondenza dei periodi sensibili dello sviluppo (Klengel et al., 2013). I risultati dello studio hanno dimostrato che l'esposizione all'Olocausto ha prodotto un effetto sulla metilazione dell'introne 7 di FKBP5 sia nei genitori sopravvissuti (F0) che nella loro prole (F1) e che i livelli di metilazione in F0 e F1 sono significativamente correlati (Yehuda et al., 2015).

Questa ed altre osservazioni hanno orientato la ricerca verso lo studio di periodi sensibili della vita, durante i quali sia le cellule germinali che gli embrioni sono suscettibili di rimodellamento ad opera dell'ambiente, inteso in senso lato come contesto alimentare, ormonale, biochimico, sociale ed emozionale.

Ne consegue che lo "stato epigenetico" dei geni è molto più dinamico rispetto alle sequenze del DNA, in quanto è soggetto a variazioni influenzate sia dall'ambiente interno che dall'ambiente esterno all'organismo (Cooney et al., 2002; Sutherland e Costa, 2003).

Come emerge dagli studi che ho via via riportato, infatti, dopo la divisione mitotica i cromosomi figli non seguono necessariamente le stesse evoluzioni ontogenetiche dei

cromosomi parentali, in seguito a sostanziali cambiamenti epigenetici. Inoltre è importante sottolineare che essi possono insorgere anche in maniera casuale, ovvero in assenza di divergenze ambientali; a questo proposito è stato osservato *in vitro* che la fedeltà del mantenimento della metilazione nelle cellule di mammifero è variabile dal 97% al 99%, mentre la metilazione *de novo* può arrivare al 5% per mitosi (Riggs et al., 1998). Infine, come ho già avuto modo di sottolineare più volte, è stato osservato sia *in vitro* che *in vivo* che le modificazioni epigenetiche possono essere trasmesse alla progenie insieme alla sequenza del DNA attraverso la linea germinale, ma tale stabilità è parziale; ovvero, sebbene durante la maturazione della linea germinale i segnali epigenetici nel gamete vengano cancellati e si costituisca un nuovo profilo epigenetico, è stato accertato che non tutti i segnali epigenetici vengono rimossi e che alcuni di essi sono trasmissibili per via epigenetica (Rakyan e Whitelaw, 2003; Cantone e Fisher, 2013).



## **LA PROGRAMMAZIONE EPIGENETICA EMBRIOFETALE DELLE MALATTIE COMPLESSE**

Con il termine “malattie complesse” ci si riferisce a tutte quelle patologie che sono geneticamente determinate, ma che non vengono ereditate secondo i meccanismi mendeliani, ovvero, non presentano le relative proprietà di segregazione, dominanza o recessività, eterozigosi o omozigosi; sono malattie poligeniche, in quanto controllate da due o più coppie di geni, ma accanto ai fattori genetici predisponenti rivestono un ruolo molto importante nell’eziopatogenesi anche i fattori ambientali, che contribuiscono, ognuno indipendentemente dall’altro, alla costituzione del fenotipo; ne consegue che le malattie complesse (o multifattoriali) sono distribuite in modo continuo nella popolazione (Cummings, 2009).

Da diversi anni la ricerca ha iniziato ad individuare il ruolo della modulazione epigenetica nell’eziopatogenesi delle malattie complesse, individuandone i meccanismi molecolari sottostanti.

In questo capitolo ne tratterò alcune, con particolare riferimento a quelle per le quali è stata dimostrata una programmazione epigenetica embrio-fetale.

### ***Malattie organiche***

#### ***Aterosclerosi***

L’aterosclerosi è un indurimento tissutale, o sclerosi, della parete interna delle arterie, l’endotelio, come conseguenza dell’accumulo di tessuto connettivo fibroso a scapito della componente elastica causato dalla formazione di placche ateromatose.

Torrens e collaboratori hanno dimostrato nei ratti l’associazione tra carenze nutrizionali materne in gravidanza e disfunzioni dell’endotelio nella prole (Torrens et al., 2009).

Le prime evidenze di una possibile associazione tra la carenza di fattori nutrizionali donatori di metili (acido Folico e vitamina B12) e aterosclerosi furono pubblicate nel 1999 (Newman, 1999); successivamente fu pubblicato un articolo che descriveva l’osservazione in

coltura dell'alterazione della metilazione del DNA su cellule trattate con elevate concentrazioni di lipoproteine plasmatiche (Lund et al., 2004); in particolare, le ricerche che seguirono dimostrarono che nelle fasi avanzate del processo di degenerazione aterosclerotica predomina l'ipometilazione del DNA e che il livello di omocisteina circolante è significativamente associato con la perdita di gruppi metile (Brattstrom e Wilcken, 2000; Zaina et al., 2005). Questo processo coinvolge numerosi geni, alcuni dei quali vanno incontro anche a ipermetilazione; ad esempio, le sequenze CpG della Superossidodismutasi extracellulare nell'aorta aterosclerotica sono ipometilate (Laukkanen et al., 1999), mentre i geni dei recettori degli estrogeni negli ateromi sono ipermetilati (Ying et al., 2000). Da queste osservazioni emerge che nell'aterosclerosi è presente un'alterazione della modulazione dei processi pro- o anti-infiammatori, normalmente espressi attraverso l'interazione con i recettori nucleari che regolano il metabolismo dei lipidi, l'infiammazione e l'omeostasi vascolare; questa modulazione è frutto di un equilibrio tra attivazione e repressione dei geni co-repressori e co-attivatori della cromatina.

Gli studi si stanno dirigendo verso la ricerca delle componenti della dieta in grado di modulare la marcatura epigenetica che altera la corretta programmazione dell'endotelio vascolare.

### *Sindrome metabolica, Diabete e Malattie cardiovascolari*

Con il termine “*Sindrome metabolica*” ci si riferisce ad un insieme di alterazioni che riguardano il metabolismo glucidico (iperglicemia e diabete di tipo 2), il metabolismo lipidico (alto livello dei trigliceridi e basso livello del colesterolo HDL), la pressione sanguigna (ipertensione arteriosa), associate ad un accumulo eccessivo di grasso viscerale e rappresenta il fattore di rischio più importante per le malattie cardiovascolari.

Come abbiamo visto, diversi studi epidemiologici hanno associato la sindrome metabolica nella prole adulta alle carenze nutrizionali materne in gravidanza (Hales e Barker, 1992; Hanson e Gluckman, 2005), ma anche all'obesità e al diabete materno (Wu e Suzuki, 2006; Hanson e Gluckman, 2008; Lukaszewski et al., 2013), oltre che allo stress, causato, ad esempio, da eventi avversi nel corso della gestazione (Fisher et al., 2012).

Inoltre, anche le consuetudini alimentari e voluttuarie paterne, quali fumo, masticazione del betel ed eccesso di apporto calorico nella dieta, sono risultate determinanti nell'incrementare il rischio di sindrome metabolica nella prole (Pembrey et al., 2006; Chen e Boucher, 2006), così come le abitudini alimentari dei nonni nei confronti dei nipoti (Pembrey et al., 2006; Kaati et al., 2007).

Ricerche effettuate sui ratti hanno associato il consumo materno in gravidanza di una dieta ricca di grassi o lo stress materno pre-natale allo sviluppo di un fenotipo obeso nella prole (Tamashiro et al., 2009; Tamashiro e Moran, 2010); in particolare, i figli di madri alimentate con tale dieta sono nati con un peso superiore alla media e sono diventati obesi, sviluppando anche una ridotta tolleranza al glucosio, in seguito allo svezzamento a 21 giorni di vita (Tamashiro et al., 2009).

L'ipotesi di un'eziopatogenesi epigenetica del diabete di tipo 2 ha iniziato ad avere la prime conferme quando, nel 2005, uno studio ha assegnato alle cause epigenetiche un indice di rilevanza tra i più alti (Jonathan et al., 2005), prendendo in considerazione il livello ematico di omocisteina, la dieta povera in composti solforati, che obbliga la sintesi della cisteina dalla metionina, ed i polimorfismi a bassa efficienza dell'enzima Metilene-tetraidrofolato riduttasi.

Come ho già avuto modo di accennare, è stata dimostrata la presenza di ipermetilazione del DNA nelle isole pancreatiche delle sequenze associate al co-attivatore trascrizionale alfa dei recettori dei proliferatori di perossisomi gamma (PPARgamma) (Puigserver e Spiegelman, 2003), osservazione che fa quindi presupporre che l'espressione dei co-attivatori trascrizionali dei PPAR, correlando positivamente con la secrezione di glucosio stimolata dall'insulina nelle isole pancreatiche, potrebbe regolare la secrezione di insulina attraverso un meccanismo epigenetico (Kaminsky et al., 2006; Junien et al., 2007; Jiang et al., 2008; Ling et al., 2008).

Inoltre, è stata descritta una zona di ipometilazione sul cromosoma 6 che comprende due geni sottoposti ad *imprinting* (PLAGLI e HYMAI), oltre a sei anomalie cromosomiche nei neonati affetti da TND (Diabete transitorio neonatale) (Mackay et al., 2008), una rara forma di diabete che si manifesta nelle prime sei settimane di vita nei neonati con ritardo nella crescita; sebbene la terapia insulinica risolva la patologia in circa tre mesi di trattamento, la

maggior parte di questi pazienti sviluppa il diabete di tipo 2 nel corso della vita (Temple e Shield, 2002).

E' importante considerare anche il fatto che, con il progredire della malattia diabetica, aumenta l'infiammazione a carico dell'apparato vascolare; alcune ricerche hanno evidenziato modificazioni epigenetiche di geni preposti all'attivazione dei processi infiammatori, in particolare di un fattore di trascrizione nucleare (NF- $\kappa$ B) che agirebbe attraverso l'iperacetilazione degli istoni di alcuni geni, tra cui quelli che regolano l'espressione del *Tumor Necrosis Factor alfa* (TNF alfa) e dell'Interleuchina 6 (IL-6) (Gerstein et al., 2008). Tra l'altro, il controllo della glicemia per 3-5 anni non riduce il rischio di complicanze vascolari nei pazienti diabetici, e questo porta a ritenere che l'alterazione epigenetica persista per almeno 5 anni (Patel et al., 2008).

Infine, è stata osservata un'attività transitoria di metilasi e demetilasi istoniche, in grado di indurre variazioni epigenetiche a carico di alcuni fattori di modulazione dell'infiammazione in seguito ad un temporaneo incremento della glicemia; questo meccanismo potrebbe giustificare la presenza di una "memoria iperglicemica", proposta in alcuni recenti studi epidemiologici (Brasacchio et al., 2009).

## ***Malattie neurodegenerative***

### *Alzheimer*

La malattia di Alzheimer è un disordine neurodegenerativo che ha una prevalenza dell'1,9% nella popolazione generale, che sale al 13% dopo i 65 anni di età, rappresentando, quindi, la principale causa di demenza nell'adulto; da un punto di vista clinico è caratterizzata da perdita di memoria, alterazioni delle funzioni intellettive e deterioramento delle capacità cognitive; dal punto di vista istopatologico sono state rilevate placche senili extracellulari costituite da agglomerati di proteina beta-amiloide insolubile e grovigli neurofibrillari intracellulari costituiti da proteina Tau iperfosforilata, con conseguente atrofia e perdita neuronale. Per la forma familiare ad esordio precoce, che rappresenta il 5-15% dei casi, sono stati individuati alcuni geni causativi che risultano mutati (APP, 21q21.2; PSEN1, 14q24.3;

PSEN2, 1q31-42); per la forma sporadica ad esordio tardivo, che rappresenta la maggioranza dei casi, sono stati individuati alleli di suscettibilità (ApoE, A2M, LRP1 ed altri) (Neri e Genuardi, 2010); ci sono, però, anche diverse evidenze che hanno dimostrato il coinvolgimento di modificazioni epigenetiche nella malattia di Alzheimer.

*In vivo e in vitro* (nei topi e in colture di cellule neuronali), infatti, è stato dimostrato che la restrizione di acido Folico e vitamina B12 nella dieta è in grado di indurre la demetilazione del gene della Presenilina 1 (PSEN1), con conseguente aumento di agglomerati di proteina beta-amiloide (Fuso et al., 2008). Attraverso l'analisi di sangue e cervello di pazienti affetti da Alzheimer sono state osservate anomalie nella metilazione dei geni collegati alla produzione e al deposito delle placche amiloidi (PSEN1 e ApoE) (Wang et al., 2008) e una marcata riduzione della metilazione del DNA è stata osservata durante l'analisi post-mortem di cervelli umani (Mastroeni et al., 2010); risultati interessanti sono pervenuti anche dall'analisi della metilazione nella corteccia frontale di gemelli monozigoti discordanti per la malattia di Alzheimer (Mastroeni et al., 2009), dove è stata riscontrata ipometilazione esclusivamente a carico del gemello affetto. Ancora più recente è l'osservazione di un aumento progressivo della metilazione all'avanzare della malattia a carico del gene DUSP22 a livello ippocampale, che regola l'espressione della proteina Tau, che ha fatto ipotizzare una correlazione tra l'accumulo di questa proteina e l'inattivazione epigenetica del gene DUSP22 (Sanchez-Mut et al., 2014).

Inoltre, per quanto riguarda la programmazione epigenetica embrio-fetale, è stato dimostrato che l'esposizione di scimmie in gravidanza al piombo ha provocato modificazioni epigenetiche a carico dei geni APP e PSEN1, con conseguente aumento della formazione di placche amiloidi in età adulta nella progenie (Wu et al., 2008).

## ***Disturbi del neurosviluppo***

### ***Schizofrenia***

La schizofrenia è un disordine del neurosviluppo che ha un'incidenza dello 0.5-1% sulla popolazione e una prevalenza nel sesso maschile (McGrath et al., 2004); dal punto di vista

clinico è caratterizzata da sintomi positivi, quali i deliri e le allucinazioni, e da sintomi negativi, quali l'affettività appiattita o inappropriata, la catatonìa, l'abulia, l'alogia e l'anedonia. Nell'eziopatogenesi della schizofrenia sono certamente implicati fattori genetici (Kendler et al., 1996), ma questi non riescono a spiegare completamente la patologia; è stato osservato che i fattori di rischio ambientali rivestono un ruolo altrettanto importante. Ad esempio, è stata osservata un'incidenza maggiore di psicosi tra i migranti norvegesi negli Stati Uniti già dagli anni '30 del XX secolo (Ödegaard, 1932) e questa osservazione è stata confermata in Inghilterra (Coid et al., 2008) e approfondita con una metanalisi in contesti più ampi (Cantor-Graae e Selten, 2005). Certamente l'immigrazione rappresenta un'esperienza altamente traumatica e stressante, in grado di indurre difficoltà di integrazione sociale che possono evolvere in stati sociopatici, e il già citato studio di Meaney condotto sui ratti ha dato una possibile spiegazione in chiave epigenetica a questo fenomeno (Meaney, 2001), dimostrando il coinvolgimento della metilazione del DNA e dell'acetilazione istonica nella modulazione della risposta emotiva alle condizioni di stress (Meaney e Szyf, 2005). Successivamente alcuni studi hanno correlato il basso livello socio-economico e il contesto ambientale urbano a carenze nutrizionali nelle molecole donatrici di metili (Picker e Coyle, 2005); l'incidenza della schizofrenia, dunque, sarebbe riconducibile ad un basso livello ematico di folati (Muskiet e Kemperman, 2006) o a polimorfismi correlati al loro metabolismo (Abdolmaleky et al., 2006). I soggetti omozigoti per una comune variante ipoattiva della Metilene-tetraidrofolato reduttasi hanno un incremento del rischio di schizofrenia superiore rispetto alla popolazione non portatrice di tale polimorfismo, pari a circa una volta e mezzo (Muntjewerff et al., 2006); i promotori dei geni che esprimono la Catecol-metiltransferasi e la Glutammato-decarbossilasi, enzimi importanti per il catabolismo di dopamina, adrenalina e noradrenalina, sono spesso ipometilati nei soggetti schizofrenici o affetti da sindrome depressiva bipolare (Abdolmaleky et al., 2006).

Inoltre, è stata rilevata una sotto regolazione e un'ipermetilazione della relina nei neuroni dei soggetti schizofrenici (Grayson et al., 2005; Grayson et al., 2006), presumibilmente a causa dell'iperattività dell'enzima DNA-metiltransferasi (Tremolizzo et al., 2002), che è risultato sovraespresso negli interneuroni corticali (Veldic et al., 2005). La relina è una glicoproteina presente principalmente nel cervello, che ha la funzione di controllare la migrazione e il posizionamento delle cellule nervose staminali durante l'embriogenesi e nelle

prime fasi post-natali, mentre nel cervello adulto regola la dislocazione dei neuroni, ed è importante nei processi di memoria attraverso la modulazione della plasticità sinaptica e la stimolazione della crescita dendritica (Niu et al., 2004).

Tra i fattori di rischio ambientali sono state individuate le infezioni virali della madre durante la gestazione, lo stress materno, complicazioni ostetriche e ipossia del feto al momento del parto (Schmitt et al., 2014).

Dal momento che la schizofrenia risulta essere più comune nel sesso maschile, è stato ipotizzato che il cervello del feto maschio possa essere più sensibile a certi fattori di stress pre-natale e a perturbazioni neuroendocrine rispetto alle femmine (Goldstein et al., 2002); a conferma di questa ipotesi i risultati di uno studio danese effettuato su 1,38 milioni di nascite dal 1973 al 1995 hanno mostrato che l'insorgenza della schizofrenia era aumentata dal 2005 nei figli di madri che avevano subito un grave lutto durante il primo trimestre di gravidanza e che la patologia si era sviluppata maggiormente nei maschi (n=4287) rispetto alle femmine (n=3044); inoltre, è stato osservato che l'esposizione allo stress del lutto nel secondo e nel terzo trimestre della gravidanza non portava ad un aumento significativo del rischio di schizofrenia, suggerendo che il primo trimestre possa essere un periodo particolarmente sensibile agli effetti della programmazione pre-natale dello stress grave acuto, soprattutto per il sesso maschile (Khashan et al., 2008). Anche in un ampio studio di coorte svedese l'aumento del rischio di schizofrenia e disturbo bipolare nella prole è stato associato al lutto di un parente di primo grado subito da madri poco prima del concepimento, durante la gravidanza o nel primo periodo post-natale, ma non sono state osservate differenze tra i sessi e non è stata circostanziata con precisione l'età gestazionale (Class et al., 2014).

In un altro studio è stato osservato che i figli che avevano perso il padre quando erano in utero avevano una maggior probabilità di sviluppare i sintomi della schizofrenia all'età di 15 anni, rispetto ai figli che avevano perso il padre nel loro primo anno di vita (Huttunen e Niskanen, 1978). In un'ampia coorte in Finlandia le gravidanze indesiderate sono state associate ad un aumento pari al doppio del rischio di schizofrenia rispetto a gravidanze cercate (Myhrman et al., 1996). Lo stress o comportamenti di salute nocivi come il fumo in gravidanza hanno aumentato il rischio di psicosi in una coorte di 963 adolescenti di età compresa tra 15 e 20 anni (Spauwen et al., 2004).

Molti altri studi epidemiologici hanno dimostrato la correlazione tra ipossia fetale (Cannon et al., 2000; Zornberg et al., 2000; Zornberg et al., 2000), infezioni materne con aumento dei livelli di IgG e IgM nel siero al momento del parto (Buka et al., 2001), esposizione materna a influenza o a toxoplasmosi (Brown et al., 2009) o a malnutrizione (Susser et al., 1996; Susser e Clair., 2008) e aumento del rischio di sviluppo nella prole di psicosi, in particolare di schizofrenia. Una lieve o moderata infezione materna è stata associata con un aumento dell'infiammazione placentare e con le modificazioni nel sistema immunitario del feto, che, insieme ad una condizione di stress post-natale e/o all'esposizione ad infezioni, sarebbe più soggetto al rischio di insorgenza di schizofrenia (Bilbo e Schwarz, 2009).

Altri studi, invece, non hanno trovato una correlazione tra infezioni e/o stress e schizofrenia (Susser et al., 1994; Selten et al., 1999; Selten et al., 2003); inoltre, molti studi si basano sulla metodologia retrospettiva e utilizzano concetti diversi di stress, rendendo, quindi, difficile l'interpretazione dei risultati (Daskalakis et al., 2013).

Le osservazioni epidemiologiche hanno spinto i ricercatori verso lo studio di modelli animali con l'obiettivo di chiarirne i meccanismi.

Deficit cognitivi simili a quelli osservati nella schizofrenia sono stati rilevati in roditori sottoposti a stress materno (Koenig et al., 2005; Meyer e Feldon, 2010); in particolare, una dieta povera di proteine e di vitamina D nel periodo che precede il concepimento e durante la gravidanza è stata associata con una diminuzione del controllo attenzionale dell'apprendimento selettivo, con un aumento dell'iperattività indotta dalle novità e anche con un aumento della sensibilità dei recettori NMDA e dei recettori D2, ma queste osservazioni non sono ancora state indagate nell'uomo. In un altro studio condotto sui topi è stato osservato che la prole di madri sottoposte a stress in gravidanza è nata pre-termine e con un peso inferiore rispetto ai topi di controllo, ed ha mostrato in seguito anomalie comportamentali, quali iperattività, deficit nell'interazione sociale e paura di condizionamento, che sono stati invertiti dal trattamento con Clozapina (Matrisciano et al., 2013); in questi animali sono state osservate modificazioni epigenetiche a livello degli interneuroni GABAergici. Inoltre, è stato osservato che lo stress prenatale è in grado di indurre nella prole adulta un aumento dell'espressione dei recettori serotoninergici 5-HT2A e



una diminuzione dei recettori metabotropici del glutammato, che sono alcuni dei target del trattamento farmacologico della schizofrenia (Halloway et al., 2013).

E' importante sottolineare che nei modelli animali studiati le modificazioni comportamentali e i deficit cognitivi simili a quelli dei pazienti schizofrenici sono stati osservati solo in età post-puberale e questo rafforza l'ipotesi che la programmazione fetale indotta dallo stress materno porti a rispondere in modo anomalo ai cambiamenti neuroendocrini che si verificano durante e dopo la pubertà, che è un periodo dello sviluppo in cui si riscontra un aumento della richiesta di energia da parte dell'organismo per sostenere l'aumentata produzione ormonale e la maturazione del cervello (Kim et al., 2015).

### *Disturbi dello spettro autistico (ASD)*

I disturbi dello spettro autistico (ASD) colpiscono l'1-2% della popolazione e hanno una prevalenza nel sesso maschile con un rapporto di 4:1 rispetto al sesso femminile (Baron-Cohen et al., 2009). Dal punto di vista clinico sono caratterizzati da compromissione più o meno marcata dei comportamenti non verbali, mancanza di reciprocità sociale o emotiva, compromissione più o meno grave della comunicazione verbale, uso di un linguaggio e/o di comportamenti ripetitivi e stereotipati, che si manifestano entro i 3 anni di età.

Come per la schizofrenia, il gene della melatonina è risultato sottoespresso anche nei soggetti affetti da disturbi dello spettro autistico (Fatemi et al., 2002; Fatemi et al., 2005). I bambini autistici hanno un basso rapporto plasmatico delle molecole donatrici di metili, osservazione che potrebbe giustificare un'alterazione nella capacità di metilare il DNA (Gaylor e Neubrander, 2004); inoltre, l'esposizione prenatale all'acido valproico, noto inibitore dell'istone-deacetilasi, predispone all'insorgenza dell'autismo (Christianson e Chesler, 1994). Circa il 5% dei pazienti autistici presenta una duplicazione della regione sottoposta ad *imprinting* del cromosoma 15, nella quale è presente il gene UBE3A, che esprime la Ubiquitina-ligasi al recettore E3A (Cook et al., 1988).

Per quanto riguarda la programmazione pre-natale di questi disturbi, è stato osservato che risposte infiammatorie della madre nel corso della gravidanza sono in grado di influenzare lo sviluppo del cervello del feto e dopo la nascita (Depino, 2013); l'esposizione della madre ad infezioni virali, infatti, ha dimostrato di aumentare il rischio di sviluppare ASD in diversi

studi (Ciaranello e Ciaranello , 1995; Singh e Jensen, 2003; Atladottir et al., 2010), anche se non in tutti (Zerbo et al., 2013). Non sono stati trovati specifici agenti infettivi responsabili dell'aumento del rischio, per cui i ricercatori ritengono che questa programmazione fetale sia dovuta all'infiammazione materna e placentare che consegue alle infezioni, che porterebbe poi a modificazioni nella risposta immunitaria fetale (Atladottir et al., 2010) e i modelli animali sono coerenti con questa ipotesi (Crawley, 2007; Malkova et al., 2012; Depino, 2013). A questo proposito le osservazioni sull'uomo suggeriscono che le infezioni materne abbiano un ruolo soprattutto se contratte nel primo trimestre di gravidanza, anche se questo necessita di ulteriori studi di conferma (Depino, 2013).

Dal momento che l'obesità è una condizione che interessa un terzo delle donne in stato di gravidanza, è stato studiato anche il suo ruolo nella programmazione pre-natale della salute mentale (Flegal et al., 2012).

Diabete, obesità e ipertensione materna in gravidanza sono stati associati ad un aumento del rischio di insorgenza di ASD in uno studio caso-controllo (Krakowiak et al., 2012), ed è stato anche osservato che l'obesità ha aumentato il rischio in bambini di due anni di età nati pre-termine ( $< 30$  settimane) (Reynolds et al., 2014). Inoltre, livelli di leptina superiori alla norma in donne obese in gravidanza sono stati associati a disfunzioni placentari e ad anomalo sviluppo cerebrale nel feto (Dodds et al., 2011; Krakowiak et al., 2012; Sullivan et al., 2014), ed è stato osservato che i bambini affetti da ASD presentano livelli plasmatici di leptina significativamente più elevati rispetto ai controlli (Ashwood et al., 2008). Una dieta ricca di grassi può causare un aumento dell'infiammazione attraverso l'innalzamento dei livelli di alcune citochine associate ai disturbi dello spettro autistico nell'uomo (Onore et al., 2012) e ci sono evidenze del fatto che l'aumento dei livelli di citochine nel corso della gravidanza abbia un impatto negativo sullo sviluppo neurale e sulle funzioni cognitive (Greenwood e Winocur, 2005; Sullivan et al., 2014). In particolare, una dieta ad alto contenuto di grassi può influenzare lo sviluppo neurologico aumentando i livelli di IL-6, IL-1beta, proteina C reattiva e del fattore di necrosi tumorale (TNF) (Das, 2001) e sopprimendo il sistema serotoninergico (Sullivan et al., 2014). Nei ratti è stato osservato che una dieta di questo tipo è in grado di provocare alterazioni delle funzioni cognitive attraverso modificazioni dell'espressione dei geni nell'ippocampo (Cordner et al., 2014).

Pochi studi hanno esaminato il ruolo del genere nella programmazione fetale del rischio di sviluppo di ASD; uno studio ha preso in esame 194 gemelli ed è stato rilevato che il distress respiratorio e l'ipossia fetali portano ad un aumento del rischio nella prole maschile, mentre l'ittero è stato associato ad un aumento del rischio nella prole femminile (Froehlich-Santino et al., 2014).

Le osservazioni effettuate sui modelli animali hanno portato ad ipotizzare che i maschi siano più soggetti a lesioni cerebrali da ipossia in quanto il testosterone sarebbe in grado di potenziarla, mentre nelle femmine il progesterone e l'allopregnanolone sarebbero protettivi (), ma al momento non è noto se questa spiegazione possa essere ritenuta valida anche per l'uomo.

E' stata indagata anche la relazione tra stress materno pre-natale e sviluppo di ASD, ma i risultati sono stati incoerenti; nel più grande studio ad oggi effettuato sulla popolazione è stato osservato che solo lo stress materno nel terzo trimestre della gravidanza ha portato ad un aumento significativo del rischio di ASD nei nati tra il 1992 e il 2000 e questo effetto è risultato essere indipendente dal sesso della prole (Class et al., 2014). Lo stress pre-natale potrebbe provocare alterazioni delle funzioni immunitarie nella prole e quindi contribuire al rischio di insorgenza dei disturbi, ma questo non è ancora stato chiarito.

### *Sindrome da deficit di attenzione e iperattività (ADHD)*

La sindrome da deficit di attenzione e iperattività (ADHD) ha una prevalenza nella popolazione del 2,5% e la maggior parte dei sintomi compaiono entro il sesto anno di età (Gaynes et al., 2014). E' caratterizzata da estrema facilità alla distrazione, incapacità di stare fermi e spesso tendenza al comportamento aggressivo immotivato, con compromissione clinicamente significativa del funzionamento sociale e scolastico.

Diversi studi epidemiologici hanno associato l'esposizione allo stress e al fumo di sigaretta della madre, soprattutto nel corso del primo trimestre di gravidanza, all'aumento del rischio di insorgenza di ADHD principalmente nel sesso maschile (Rodriguez e Bohlin, 2005). In uno studio retrospettivo caso-controllo gli eventi stressanti della madre durante la gravidanza sono stati associati con ADHD in maniera statisticamente significativa in confronto ad un fratello non affetto, ed è stata anche osservata una maggior probabilità di

incidenza nel sesso maschile (Grizenko et al., 2012). Nel corso del già citato studio di coorte danese è stata osservata anche una maggior incidenza di ADHD nei figli di madri che avevano subito un grave lutto poco prima del concepimento e nel corso della gravidanza (Class et al., 2014). Uno studio precedente aveva osservato un aumento del 72% del rischio di diagnosi di ADHD o della possibilità di ricevere un farmaco per il trattamento del disturbo nei figli maschi di madri che avevano subito un grave lutto (un altro figlio o il coniuge) durante la gravidanza, soprattutto se questo era avvenuto nel terzo trimestre (Li et al., 2010); inoltre, in questo stesso studio è stato osservato che la morte di un parente meno stretto non aveva avuto effetto sul rischio di insorgenza del disturbo, a conferma del fatto che non è l'evento stressante in sé a determinare i cambiamenti già spiegati nella regolazione dell'asse HPA, ma lo stress percepito, e quindi soggettivo, della madre, aspetto che in molti studi non viene preso in considerazione. Questo fattore è molto importante, perché un maggiore stress percepito in risposta ad un evento o condizione è associato con una maggior attivazione dell'asse HPA e quindi della risposta immunitaria.

Infatti, in un piccolo studio retrospettivo caso-controllo è stato osservato che le madri di bambini a cui è stato diagnosticato l'ADHD riportavano un grado di soddisfazione coniugale e di eventi di vita positivi molto basso relativamente al periodo della gravidanza (Lee et al., 2006) e uno studio di coorte prospettico ha associato lo stato di ansia materno a 12-22 settimane di gravidanza con l'insorgenza dei sintomi di ADHD nei loro figli all'età di 8-9 anni, ma non nell'ultimo trimestre (Van den Bergh e Marcoen, 2004). Al contrario, uno studio più ampio non ha trovato alcuna correlazione tra lo stato di ansia materna diagnosticata in gravidanza con l'insorgenza di ADHD nei figli (Martini et al., 2010).

In generale si può affermare che tutti questi studi evidenziano la potenziale interazione tra gravità del fattore di stress materno, periodo gestazionale di esposizione e sesso della prole nella programmazione fetale del rischio di insorgenza del disturbo.

Una ricerca condotta sui roditori utilizzando il modello dello stress cronico variabile ha dimostrato l'associazione tra induzione di infiammazione placentare e sviluppo dei sintomi di iperattività nel sesso maschile e non in quello femminile (Bronson e Bale, 2014); i ricercatori hanno anche dimostrato che il trattamento con un farmaco antinfiammatorio non steroideo (FANS) durante l'esposizione materna allo stress ha diminuito l'espressione del marker

dell'infiammazione IL-6 a livello placentare, permettendo di prevenire nei maschi l'insorgenza del fenotipo comportamentale relativo all'ADHD.

Questi dati forniscono un ulteriore supporto all'importanza dell'infiammazione nella programmazione fetale dell'ADHD, anche se ad oggi non è ancora certo che il modello di iperattività nei roditori possa essere adeguato per i sintomi di ADHD nell'uomo.

E' interessante sottolineare infine, che, oltre all'infiammazione, anche l'esposizione in utero ad un aumento eccessivo di glucocorticoidi (GC) è stata collegata al successivo aumento del rischio di sviluppo di ADHD; infatti, uno studio retrospettivo ha dimostrato che la somministrazione esogena ripetuta di GC in donne a rischio di parto pre-termine ha provocato l'insorgenza dei sintomi di ADHD in bambini di età compresa tra 3 e 6 anni (French et al., 2004).

### *Disturbi d'ansia e dell'umore*

I dati più recenti e più cospicui sugli effetti dell'ansia pre-natale sono forniti da uno studio prospettico longitudinale effettuato su un'ampia coorte di genitori e bambini (n=7944), grazie al quale è stato osservato che l'ansia materna durante la gravidanza può indurre nei figli un aumento del rischio di insorgenza di disturbi mentali, che persistono anche in adolescenza (O'Donnell et al., 2014); in particolare, è stato osservato che l'ansia pre-natale provoca dei cambiamenti nelle risposte al cortisolo al risveglio e nella sua regolazione diurna negli adolescenti (O'Donnell et al., 2013).

Nei roditori sono stati rilevati comportamenti ansiosi in seguito all'esposizione in utero ad un lipopolisaccaride (LPS) che mima l'esposizione ad un agente infettivo, determinando una disregolazione immunitaria materna (Walker et al., 2009; Walker et al., 2010); gli animali trattati con LPS hanno mostrato anche un incremento dell'attività del Sistema Nervoso Autonomo (ANS), suggerendo che sia l'asse HPA, sia l'ANS vengano persistentemente e anomalmente colpiti dalla disregolazione immunitaria pre-natale (Sominsky et al., 2013).

Inoltre, come accennato in precedenza per i disturbi dello spettro autistico, anche una dieta materna ad alto contenuto di grassi è in grado di causare una disregolazione immunitaria e un innalzamento dei livelli di glucocorticoidi.

Nei roditori questo tipo di dieta ha portato allo sviluppo di un fenotipo ansioso e all'aumento delle risposte di stress, come dimostrano l'aumentato numero di recettori per i GC nell'amigdala e i cambiamenti nell'espressione dei geni che codificano per la risposta infiammatoria sia nell'ippocampo che nell'amigdala (Sasaki et al., 2013).

Dal momento che una dieta ricca di grassi può portare ad esiti differenziali (fenotipo ansioso o disordine dello sviluppo neurologico), è stato ipotizzato che in questi effetti diversi abbiano un ruolo il periodo di esposizione nel corso della gravidanza e il sesso della prole (Sullivan et al., 2014).

Per quanto riguarda il disturbo depressivo maggiore è stato stabilito che sia la prima causa di malattia tra le donne di tutto il mondo (sito internet?), ma nonostante questo sono ancora pochi gli studi che hanno indagato il possibile ruolo dello stress materno, dell'infiammazione o dell'esposizione ad un eccesso di glucocorticoidi in gravidanza sull'aumento del rischio di insorgenza di depressione nella prole adulta.

Alcuni studi si sono concentrati sugli effetti della riduzione della crescita fetale ma i risultati sono stati contraddittori (Fisher et al., 2006). In una coorte di nati tra il 1959 e il 1966 (n=1101) non è stata rilevata alcuna associazione tra ridotta crescita fetale, basso peso alla nascita e parto pre-termine e sviluppo di depressione maggiore nella prole (Vasiliadis et al., 2008); è importante sottolineare che in questo studio non sono stati presi in considerazione fattori quali il sesso della prole, l'età della prole al momento della valutazione dello stato di depressione e se i soggetti osservati avevano subito nel corso della loro vita un ulteriore fattore di grave stress, limitando, quindi, la possibilità per i ricercatori di stabilire un possibile collegamento tra i fattori pre-natali e lo sviluppo della malattia da adulti. Un altro studio invece, ha esaminato i risultati tenendo in considerazione il genere, osservando che le femmine con un basso peso alla nascita presentavano all'età di 21 anni un rischio maggiore di sviluppare la depressione rispetto ai maschi (Alati et al., 2007). Inoltre, in uno studio condotto su adolescenti di entrambi i sessi è stato osservato che il basso peso alla nascita era predittivo del rischio di depressione solo nelle femmine che erano state esposte ad altre avversità nell'infanzia (Costello et al., 2007).

E' stato ipotizzato che la depressione materna in gravidanza possa aumentare il rischio di insorgenza di depressione nei figli adulti attraverso il meccanismo già descritto dell'esposizione fetale a livelli aumentati di GC, che portano ad un alterata regolazione

dell'asse HPA (Goodmann e Gotlib, 1999), soprattutto in considerazione del fatto che è più probabile che uno stress cronico in gravidanza porti ad uno sviluppo anomalo fetale dell'asse HPA rispetto ad uno stress acuto (Weinstock, 2005) e non vi è dubbio che la depressione materna possa essere considerata un fattore di stress cronico, anche perché molte donne che ne sono affette sono portate a non cercare o ad interrompere i trattamenti per questo disturbo durante la gravidanza.

Stanno iniziando ad emergere i risultati di alcuni studi prospettici che suggeriscono che la depressione materna sia un fattore di rischio indipendente per l'insorgenza di disturbo depressivo maggiore nei figli adulti (Pearson et al., 2013; Betts et al., 2014); Pearson e collaboratori, ad esempio, hanno osservato che all'età di 18 anni i figli di madri depresse nel corso della gravidanza presentavano un rischio di insorgenza del disturbo 1,28 volte più alto per ogni aumento di deviazione standard del punteggio ottenuto dalle madri ai test di controllo per depressione post-partum; inoltre, lo stesso studio ha fornito una conferma alla programmazione fetale dovuta all'esposizione a depressione materna, in quanto è stato osservato che la presenza di disturbo depressivo maggiore nel padre durante il periodo di gravidanza della moglie non ha inciso sull'aumento del rischio nella prole.

Gli studi condotti sugli animali hanno mostrato che un moderato stress pre-natale è in grado di provocare comportamenti depressivi in roditori di entrambi i sessi attraverso la già vista programmazione epigenetica della risposta di stress (Darnaudery e Maccari, 2008); inoltre, è stato dimostrato che la depressione materna è associata a down-regulation a livello placentare dell'espressione dell'enzima monoammine-ossidasi A (MAO-A), che potrebbe modificare l'esposizione del feto a neurotrasmettitori quali la serotonina, che sono implicati nello sviluppo del cervello e nella regolazione degli stati affettivi (Blakeley et al., 2013). Inoltre, è stato osservato nei ratti che lo stress pre-natale altera l'espressione del gene che codifica per il fattore neurotrofico BDNF nell'ippocampo e nell'amigdala, attraverso l'ipermetilazione a livello dell'esone 4, con conseguente diminuzione dell'espressione genica (Boersma et al., 2014).

Ovviamente è importante considerare che, se da un lato gli studi sugli animali possono fornire indizi utili per la comprensione dei meccanismi che sottendono la programmazione fetale, dall'altro mancano di validità di facciata, in quanto viene a mancare la complessità dell'esperienza umana emotiva e psicologica quotidiana di fronte alle condizioni di stress.

## CONCLUSIONI

Mentre, quando era dominante il “dogma centrale della biologia molecolare” di Crick, la vita era concepita come il casuale prodotto dell’informazione genica, con il paradigma epigenetico la vita diventa capace di retroagire sulle condizioni che l’hanno prodotta; si passa, quindi, da una visione deterministica e meccanicistica ad una complessa e sistemica: il DNA è solo la molecola di base, un prodotto potenziale che fa parte di un network molecolare complesso contenuto nel nucleo di tutte le cellule e composto da proteine, enzimi, RNA minori che ruotano attorno al DNA, riconfigurandolo continuamente.

In questa visione acquista un’importanza fondamentale il flusso continuo di informazioni chimico-fisiche e psichiche che arrivano all’individuo dall’ambiente fisico e sociale in cui vive e che lo inducono a modificarsi nel tempo nella sua componente epigenetica.

La variabilità della metilazione del genoma, infatti, è funzione delle condizioni metaboliche, della dieta, degli stili di vita, dello stress, dell’età e dell’assetto genomico; ne consegue che ogni trasformazione del fenotipo è indotta dall’ambiente, modulata epigeneticamente e condizionata geneticamente.

Inoltre, i numerosi studi epidemiologici su larga scala condotti nel corso degli anni ’90 da David Barker e collaboratori hanno portato Barker stesso all’elaborazione della teoria delle origini embrio-fetali delle malattie dell’adulto, in base alla quale la carenza nutrizionale materna nel corso della gestazione, che porta ad un rallentamento della crescita del feto con basso peso alla nascita, sarebbe in grado di programmare l’insorgenza in età adulta di cardiopatia coronarica e dei disturbi ad essa associati, quali infarto, ipertensione e diabete di tipo 2, fornendo, come spiegazione causale, il modello del “fenotipo parsimonioso”, secondo cui il feto modificherebbe il proprio fenotipo in maniera adattiva e predittiva in risposta a stimoli nutrizionali o ormonali provenienti dalla madre, al fine di riuscire a sopravvivere alla nascita, nel caso in cui l’ambiente continuasse ad essere sfavorevole. L’arricchimento nutrizionale dopo la nascita, invece, causerebbe una “sprogrammazione” di queste modifiche adattive, esponendo l’individuo ad un aumento del rischio di incidenza di malattia.



Nel corso di questo lavoro ho mostrato come l'ipotesi di Barker abbia avuto nel corso degli ultimi vent'anni molteplici e importanti riscontri epidemiologici in vari Paesi del mondo e come gli studi sperimentali, sia sull'animale che sull'uomo, siano stati in grado di fornire una spiegazione causale scientifica a tale ipotesi attraverso la scoperta dei meccanismi epigenetici che sottendono il fenomeno.

Ne sono un esempio il "Dutch Famine Study", che ha dimostrato che i cosiddetti "figli dell'inverno di fame" olandese a distanza di sessant'anni presentavano un'ipometilazione del gene che controlla la sintesi di Igf2, il fattore insulino-simile che regola la crescita del feto; gli studi sugli *interferenti endocrini*, che hanno dimostrato come l'esposizione pre-natale ad alcuni EDC (DDT, metossicloro, BPA, DEHP, DBP) influenzi la programmazione fetale dell'obesità dell'adulto e per le successive tre generazioni, attraverso l'ipermetilazione del gene che codifica per il recettore nucleare PPARgamma, con conseguenti effetti obesogenici; gli studi sugli effetti di una dieta ricca di grassi e mono-saccaridi da parte della madre in gravidanza, che causa attivazione epigenetica del fattore NF-kB, con conseguente effetto pro-infiammatorio attraverso l'aumento dell'espressione di TNF alfa e di IL-6; gli studi sull'effetto dello stress subito dalla madre in gravidanza, che causa ipometilazione del gene che codifica per il co-chaperone FKBP5, un importante regolatore del legame dei glucocorticoidi al loro recettore.

Ho mostrato anche come le critiche alla teoria di Barker siano state negli anni invalidate e ritengo importante sottolineare come i risultati del citato studio sulla popolazione di Leningrado, che soffrì la fame analogamente alla popolazione olandese nel corso dell'occupazione tedesca durante la Seconda guerra mondiale, in realtà non abbiano portato evidenze contrarie a quelle giunte dal "Dutch Famine Study"; infatti, la mancata osservazione dell'aumento del rischio di insorgenza di malattie nella popolazione divenuta adulta può essere letta come una conferma all'ipotesi del "fenotipo parsimonioso", in quanto i figli nati dalle madri che avevano sofferto la fame in gravidanza a Leningrado hanno continuato a vivere in condizioni di restrizione alimentare anche in seguito nel corso della loro vita, a causa dell'avvento del Comunismo.

Al contrario, in Olanda alla fine della guerra le condizioni alimentari tornarono nella norma e questo causò la "sprogrammazione" del fenotipo della prole, che si era adattato a

sopravvivere in condizioni di privazione nutrizionale, provocando nel tempo l'aumento dell'insorgenza di obesità, malattie cardiovascolari, diabete di tipo 2, ipertensione e aterosclerosi.

In particolare, la maggior parte degli studi ha dimostrato che i “periodi critici” per quanto riguarda la programmazione fetale delle sopracitate malattie sono il primo e il terzo trimestre della gravidanza, suggerendo che essi riflettano i periodi sensibili nello sviluppo dei vari organi implicati, che si verificano in fasi diverse della crescita fetale.

Ricerche più recenti si sono concentrate, invece, sull'analisi della programmazione fetale delle malattie del neurosviluppo, quali schizofrenia, disturbi dello spettro autistico, ADHD e disturbi d'ansia e dell'umore.

Queste hanno dimostrato che il “periodo “critico” per lo sviluppo neurologico e psichiatrico è il terzo trimestre della gravidanza, ad eccezione della schizofrenia, per la quale è stato osservato che il “periodo critico” è rappresentato dal primo trimestre.

I risultati sono stati a volte incoerenti e quindi lontani dall'essere conclusivi, ma ci sono sempre più numerosi dati convincenti che suggeriscono che l'esposizione pre-natale alla “disregolazione” dell'asse HPA della madre indotta da eventi di vita o condizioni stressanti, l'esposizione a livelli eccessivi di glucocorticoidi e stati di infezione/inflammation della madre siano in grado di produrre modificazioni epigenetiche sia a livello placentare che nel feto, programmando all'aumento del rischio di insorgenza nell'infanzia, in adolescenza e nell'età adulta delle citate malattie neurologiche e psichiatriche.

Inoltre, le ricerche in questo campo hanno evidenziato l'importanza dello stress percepito, ovvero della misura in cui esso attiva l'asse HPA materno e conseguentemente la risposta immunitaria, aspetto che è ovviamente impossibile da rilevare negli studi sugli animali.

Infine, è interessante sottolineare che sono state osservate differenze di genere nell'aumento del rischio di incidenza dei disturbi in seguito a programmazione fetale, ma ad oggi non è ancora stato chiarito se queste siano attribuibili ad essa o ad altri fattori; hanno permesso però di evidenziare l'importanza dell'interazione tra esposizione fetale ed esposizione nelle prime fasi della vita, i primi due anni in particolare, nella manifestazione dei sintomi di malattia in seguito, portando i ricercatori a modificare leggermente il concetto espresso da Barker, il quale affermava che “l'utero era più importante della casa”; Kim e

collaboratori hanno preferito affermare che “l’utero è importante tanto quanto la casa” (Kim et al., 2015).

La programmazione fetale dei disturbi del neurosviluppo è oggi un’area di continua ricerca.

Questo complesso insieme di dati porta alla conclusione che, accanto alla tradizionale mutazione genica, casuale e rara, e alla selezione a livello di popolazione, deve essere considerata una terza componente, ovvero la programmazione durante lo sviluppo pre-natale, il cosiddetto “*Fetal programming*”. L’ontogenesi embriofetale, infatti, è il periodo più importante della vita sul piano biologico; nel corso dei nove mesi di gestazione il feto programma la propria biochimica in base alle informazioni che gli arrivano attraverso la madre in maniera adattiva e predittiva, come avevano supposto Barker e Hales nel loro paradigma del “fenotipo parsimonioso”, grazie alla plasticità che caratterizza il periodo dello sviluppo, che è massima nel corso dell’ontogenesi (“*Developmental plasticity*”).

Le informazioni che arrivano al feto attraverso la madre possono essere di natura alimentare, ormonale, biochimica, sociale ed emozionale; tra questi ho portato esempi nel corso di questo lavoro relativamente alla carenza nutrizionale (deplezione di folati, vitamina B12, colina, betaina, proteine), all’eccesso nutrizionale (dieta ricca di acidi grassi e monosaccaridi), agli *interferenti endocrini* (pesticidi, benzopirene, metalli pesanti) e allo stress.

I primi stadi dello sviluppo, dunque, rappresentano un periodo cruciale per la formazione e il mantenimento delle marcature epigenetiche, che potranno persistere per tutta la vita dell’individuo; inoltre, l’esposizione a determinate condizioni ambientali nel periodo embrionale è in grado di influenzare la suscettibilità alle malattie nel corso della generazione successiva o di più generazioni, come hanno dimostrato, ad esempio, gli studi citati sugli *interferenti endocrini*.

Ne consegue che l’epigenetica può avere molteplici implicazioni: innanzi tutto può consentire di rintracciare nelle “impostazioni iniziali della vita” le radici di disordini che si manifestano nella vita adulta; può aprire possibilità di diagnosi precoce su modificazioni cellulari epigenetiche, che possono portare a patologie quali cancro, malattie cardiovascolari, malattie autoimmuni, disturbi del neurosviluppo ed altre; può aprire la possibilità di attuare

interventi di correzione della marcatura epigenetica, sia tramite farmaci, sia tramite il comportamento, quali alimentazione, attività fisica, gestione dello stress, ecc.

E' ormai appurato, quindi, che non è possibile valutare il rischio di incidenza di una patologia associabile a specifiche variazioni genetiche senza considerare il contesto ambientale che condiziona l'espressione o il silenziamento di tali varianti genetiche.

Questo rappresenta una grande sfida per il futuro della Genetica medica e dell'epidemiologia, aprendo uno scenario molto complesso e inimmaginabile fino a pochi anni fa, quando gli esiti del Progetto Genoma sembravano un punto di arrivo.

Il Progetto Epigenoma Umano è iniziato ed è ancora in corso.

## IL RUOLO DELLO PSICOLOGO

Da quanto esposto in questo lavoro ritengo che sia sempre più importante la messa in atto di un approccio alla cura, composta di prevenzione e terapia, che sia realmente integrato, cioè in grado di fornire una consulenza qualificata sugli stili di vita, che come abbiamo visto sono i principali determinanti della salute, di offrire un programma di cura che lavori sia sulla dimensione psichica che su quella biologica e di garantire un uso dei presidi terapeutici che non sia esclusivamente o preponderantemente ristretto alla farmacologia di sintesi.

Questo significa abbandonare definitivamente il modello biomedico di spiegazione delle malattie e di trattamento delle stesse, in base al quale la salute, la malattia e le caratteristiche individuali dipendono da fattori elementari, quali geni, microrganismi o alterazioni strutturali, che la medicina può individuare e risolvere, mettendo la salute nelle mani della scienza, del medico e, quindi, della farmacologia e della chirurgia.

Al contrario, il paradigma epigenetico e quello psiconeuroendocrinoimmunologico offrono una visione della salute e della malattia come dipendenti, in larga misura, dall'organizzazione della vita, la quale dipende a sua volta dal tipo di organizzazione sociale e dai comportamenti di ciascun individuo. In questa visione le rappresentazioni che la società ha della salute, della malattia e della scienza costituiscono il quadro di riferimento strutturale su cui si organizza l'individuo; conseguentemente la rappresentazione che l'individuo ha di se stesso influenza fortemente la sua condizione di salute e di benessere, ad esempio in base al suo "senso di coerenza" (Antonovsky, 1985), al suo senso di "intrinseca adeguatezza" (Gadamer, 1994) e al suo senso di "auto-efficacia" (Bandura, 1977).

La salute, dunque, è un attributo e una responsabilità dell'individuo, come emerge chiaramente dai tanti esempi che ho riportato nel corso di questo lavoro.

L'alimentazione, la sedentarietà, lo stress, l'inquinamento ambientale e farmacologico producono una marcatura epigenetica fin dagli esordi della vita nell'utero materno e poi nel corso della vita adulta e in quella delle generazioni che si susseguono; aver compreso che questa marcatura è prevenibile e reversibile attraverso l'adozione di comportamenti adeguati

e cure non necessariamente farmacologiche assegna una grande responsabilità non soltanto all'individuo, ma anche a tutti gli operatori sanitari.

E' in questa ottica che si inserisce, a mio avviso, l'importante ruolo dello psicologo, che, accanto a quello del medico, dovrebbe svolgere il compito del "prendersi cura", fatto non solo di prescrizione e contenimento, ma soprattutto di capacità di relazione e di informazione, fatto di motivazione e di sostegno, affinché l'individuo possa realizzare consapevolmente la propria programmazione comportamentale verso la salute e il benessere e possa gestire al meglio le condizioni di stress, sia acute che croniche, in modo da minimizzarne gli effetti di soppressione e/o disregolazione sul sistema immunitario.

## BIBLIOGRAFIA

- AAGAARD-TILLERY, K.M., GROVE, K., BISHOP, J. (2008), Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: maternal diet modifies the primate fetal epigenome. *J Mol Endocrinol*, 41: 91-102.
- ABDOLMALEKY, H.M., CHENG, K.H., FARAONE, S.V., WILCOX, M., GLATT, S.J., GAO, F., SMITH, C.L., SHAFI, R., AEALI, B., CARNEVALE, J., PAN, H., PAPAGEORGIS, P., PONTE, J.F., SIVARAMAN, V., TSUANG, M.T., THIAGALINGAM, S. (2006), Hypomethylation of MB-COMT promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Human Molecular Genetics*, 15: 3132-45.
- ADAIR, L.S. (2001), Size at birth predicts age at menarche. *Pediatrics*, 107: e59.
- ADENOT, P.G., MERCIER, Y., RENARD, J.P., THOMPSON, E.M. (1997), Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development*, 124: 4615-25.
- AHLGREN, M., MELBYE, M., WOHLFAHRT, J., SORENSEN, T.I.A. (2004), Growth patterns and the risk of breast cancer in women. *New England Journal*, 351: 1619-26.
- ALAM, S.E., SINGH, R.B., GUPTA, S., DHERANGE, P., DE MEESTER, F., WILCZYNSKA, A., DHARWADKAR, S., WILSON, D., HUNGIN, P. (2012), Nutritional aspects of epigenetic inheritance. *Can J Physiol Pharmacol*, 90(8): 989-994.
- ALBERTS, B. (2008), *The molecular biology of the Cell*, fifth ed., Garland Science, New York.
- AMARAL, P.P., DINGER, M.E., MERCER, T.R., MATTICK, J.S. (2008), The eukaryotic genome as an RNA machine. *Science*, 319: 1787-9.
- AN, Z. (2009), *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*. Wiley, Hoboken.
- ANTONOV, A.N. (1947), Children born during the siege of Leningrad in 1942. *J Pediatr*, 30: 250-9.
- ANTONOVSKY, A. (1985), The life cycle, mental health and the sense of coherence. *Isr J Psychiatry Relat Sci*, 22(4): 273-80.
- ANWAY, M.D., CUPP, A.S., UZUMCU, M., SKINNER, M.K. (2005), Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, 308(5727): 1466-9.

- ANWAY, M.D., LEATHERS, C., SKINNER, M.K. (2006), Endocrine disruptors vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult onset disease. *Endocrinology*, 147(12): 5515-23.
- ARTHUR, W. (2004), *Biased embryos and evolution*. 2004, Cambridge; New York: Cambridge University Press. XIII, p. 233.
- ASHWOOD, P., KWONG, C., HANSEN, R., HERTZ-PICCIOTTO, I., CROEN, L., KRAKOWIAK, P. (2008), Brief report: plasma leptin levels are elevated in autism: association with early onset phenotype? *J Autism Dev Disord*, 38(1): 169-75.
- ATLADOTTIR, H.O., THORSEN, P., OSTERGAARD, L., SCHENDEL, D.E., LEMCKE, S., ABDALLAH, M. (2010), Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*, 40(12): 1423-30.
- ATLADOTTIR, H.O., THORSEN, P., SCHENDEL, D.E., OSTERGAARD, L., LEMCKE, S., PARNER, E.T. (2010), Association of hospitalization for infection in childhood with diagnosis of autism spectrum disorders: a Danish cohort study. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 164(5): 470-7.
- BALE, T.L. (2011), Sex differences in prenatal epigenetic programming of stress pathways. *Stress*, 14(4): 348-56.
- BALTIMORE, D. (1970), RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, 226(5252): 1209-11.
- BANDURA, A. (1977), Self-efficacy: toward a unifying theory of behavioral change. *Psychology Review*, 84(2): 191-215.
- BARKER, D.J.P. (1994), *Mothers, babies and disease in later life*. London: BMJ Publishing Group, 1994.
- BARKER, D.J.P. (1995), Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*, 311: 171-4.
- BARKER, D.J.P. (1998). In utero programming of chronic disease. *Clinical Science*, 95: 115-128.
- BARKER, D.J.P. (2004), The developmental origins of well-being. *Phil Trans R Soc Lond B*, 359: 1359-66. doi: 10.1098/rstb.2004.1518
- BARKER, D.J.P., BULL, A.R., OSMOND, C., SIMMONDS, S.J. (1990), Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ*, 301:259-62.
- BARKER, D.J.P., ERIKSSON, J.G., FORSÉN, T., OSMOND, C. (2002a), Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol*, 31: 1235-9.



- BARKER, D.J.P., FORSÉN, T., ERIKSSON, J.G., OSMOND, C. (2002b), Growth and living conditions in childhood and hypertension in adult life: longitudinal study. *J Hypertens*, 20: 1951-6.
- BARKER, D.J.P., GLUCKMAN, P.D., GODFREY, K.M., HARDING, J.E., OWENS, J.A., ROBINSON, J.S. (1993), Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*, 341: 938-41.
- BARKER, D.J.P., GODFREY, K.M., FALL, C. (1991), Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. *BMJ*, 303: 671-5.
- BARKER, D.J.P., HALES, C.N., FALL, C.H.D., OSMOND, C., PHIPPS, K., CLARK, P.M.S. (1993), Type 2 diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*, 36: 62-7.
- BARKER, D.J.P., OSMOND, C., RODIN, I., FALL, C.H.D., WINTER, P.D. (1995), Low weight gain in infancy and suicide in adult life. *BMJ*, 311: 1203.
- BARKER, D.J.P., OSMOND, C., SIMMONDS, S.J., WIELD, G.A. (1993), The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *BMJ*, 306: 422-6.
- BARKER, D.J.P., OSMOND, C., WINTER, P.D., MARGETTS, B., SIMMONDS, S.J. (1989), Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*, 2: 577-80.
- BARON-COHEN, S., SCOTT, F.J., ALLISON, C., WILLIAMS, J., BOLTON, P., MATTHEWS, F.E. (2009), Prevalence of autism-spectrum conditions: UK school-based population study. *Br J Psychiatry*, 194(6): 500-9.
- BARRACLOUGH, C.A. (1961), Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology*, 68: 62-7.
- BARTON, S.C., SURANI, M.A., NORRIS, M.L. (1984), Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature*, 311: 374-6.
- BASTOS SALES, L., KAMSTRA, J.H., CENIJN, P.H., VAN RIJT, L.S., HAMERS, T., LEGLER, J. (2013), Effects of endocrine disrupting chemicals on in vitro global DNA methylation and adipocyte differentiation. *Toxicol in Vitro*, 27(6): 1634-43.
- BATESON, P. (2001), Fetal experience and good adult design. *Int J Epidemiol*, 30: 928-34.
- BATESON, P., BARKER, D.J.P., CLUTTON-BROCK, T. (2004), Developmental plasticity and human health. *Nature*, 430: 419-21.

- BATISTA, P.J., CHANG, H.Y. (2013), Long Noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell*, 152: 1298-1307.
- BECK, A.T. (1976), *Cognitive therapy of emotional disorders*. New American Library, New York.
- BELL, C. (2004), Long term mortality after starvation during the Leningrad siege: no evidence that starvation around puberty causes later cardiovascular disease. *BMJ*, 328-46.
- BENNETT, S.T., WILSON, A.J., ESPOSITO, L. (1997), Insulin VNTR allele-specific effect in type 1 diabetes depends on the identity of untransmitted paternal allele. *Nature Genetic*, 17: 350-2.
- BERKOVITZ, G.S., PANINSK, R.H., DOLGIN, S.E., GAZELLA, J.G., BODIAN, C.A., HOZMAN, I.R. (1993), Prevalence and natural history of cryptorchidism. *Pediatrics*, 92: 44-9.
- BESTOR, T. H., LAUDANO, A., MATTALIANO, R., INGRAM, V. M. (1988), Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Molecular Biology*, 203: 971-83.
- BESTOR, T.H., INGRAM, V.M. (1983), Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequences specificity and mode of interaction with DNA. *Proc. National Academic Science USA*, 80: 5559-63.
- BHARGAVA, S.K., SACHDEV, H.P.S., FALL, C.H.D., OSMOND, C., LAKSHMY, R., BARKER, D.J.P., BISWAS, S.K.D., RAMJI, S., PRABHAKARAN, D., REDDY, K.S. (2004), Relation of serial changes in childhood body-mass index to impaired glucose tolerance in young adulthood. *New England Journal of Medicine*, 350: 865-75.
- BIANCHI, I., LLEO, A., GERSHWIN, M.E., INVERNIZZI, P. (2012), The X chromosome and immune associated genes. *Journal Autoimmunity*, 38(2-3): J187-92.
- BILBO, S.D., SCHWARZ, J.M. (2009), Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front Behav Neurosci*, 3: 14.
- BINDER, E.B., (2009), The role of FKBP5, a co-chaperone, of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 34 Suppl 1: S186-S195.
- BINDER, E.B., BRADLEY, R.G., LIU, W., EPSTEIN, M.P., DEVEAU, T.C., MERCER, K.B. (2008), Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of post-traumatic stress disorder symptoms in adults. *Jama*, 299: 1291-1305.

- BLEWITT, M.E., VICKARYOUS, N.K., PALDI, A., KOSEKI, H., WHITELAW, E. (2006), Dynamic reprogramming of DNA methylation at an epigenetically sensitive allele in mice. *PLoS Genet*, 2: e49.
- BLOOMFIELD, F.H., OLIVER, M.H., HAWKINS, P. (2003), A periconceptional nutritional origin for non-infectious preterm birth. *Science*, 300: 606.
- BOERSMA, G.J., LEE, R.S., CORDNER, Z.A., EWALD, E.R., PURCELL, R.H., MOGHADAM, A.A., TAMASHIRO, K.L. (2014), Prenatal stress decreases BDNF expression and increases methylation of BDNF exon IV in rats. *Epigenetics*, 9(3): 437-47.
- BOLOGNA, M. (2012), *Quando la chimica interferisce con gli ormoni*. In: BOTTACCIOLI F. (a cura di), *Stress e Vita. La scienza dello stress e la scienza della salute alla luce della Psiconeuroendocrinoimmunologia*, Tecniche Nuove, Milano, cap. 13.
- BORGHOL, N. (2012), Associations with early-life socio-economic position in adult DNA methylation. *International Journal of Epidemiology*, 41: 62-74.
- BOTTACCIOLI, F. (2008), *Il sistema immunitario: la bilancia della vita*. Tecniche Nuove, Milano.
- BOTTACCIOLI, F. (2014), *Epigenetica e Psiconeuroendocrinoimmunologia*. Edra ed., Milano.
- BOWLBY, J. (1989), *Una base sicura*. Cortina, Milano.
- BRASACCHIO, D., OKABE, J., TIKELLIS, C., BALCERCZYK, P., GEORGE, E.K., BAKER, A., CALKIN, C., BROWNLEE, M., COOPER, M.E., EL-OSTA, A. (2009), Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail. *Diabetes*, 58: 1229-36.
- BRATTSTROM, L., WILCKEN, D.E. (2000), Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? *American Journal of Clinical Nutrition*, 72: 315-23.
- BRAUN, R.E. (2001), Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet*, 28: 10-2.
- BRINK, R.A. (1954), Very light variegated pericarp in maize. *Genetics*, 39: 724-40.
- BRONSON, S.L., BALE, T.L. (2014), Prenatal stress-induced increases in placental inflammation and offspring hyperactivity are male-specific and ameliorated by maternal antiinflammatory treatment. *Endocrinology*, 155(7): 2635-46.

- BUITING, K., GROSS, S., LICH, C., GILLESSEN-KAESBACH, G., EL-MAARRI, O., HORSTHEMKE, B. (2003), Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndrome: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *American Journal of Human Genetics*, 72: 571-7.
- BUKA, S.L., TSUANG, M.T., TORREY, E.F., KLEBANOFF, M.A., BERNSTEIN, D., YOLKEN, R.H. (2001), Maternal infections and sub sequent psychosis among offspring. *Arch Gen Psychiatry*, 58(11): 1032-7.
- BYGREN, L.O., EDVINSSON, S., BROSTROM, G. (2000), Change in food availability during pregnancy: is it related to adult sudden death from cerebro- and cardiovascular disease in offspring? *Am J Human Biol*, 12:447-53.
- CANNON, T.D., ROSSO, I.M., HOLLISTER, J.M., BEARDEN, C.E., SANCHEZ, L.E., HADLEY, T.A. (2000), A prospective cohort study of genetic and perinatal influences in the etiology of schizophrenia. *Schizophr Bull*, 26(2): 351-66.
- CANTONE, I., FISHER, A.G. (2013), Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(3): 282-9. doi: 10.1038/nsmb.2489
- CANTOR-GRAAE, E., SELTEN, J.P. (2005), Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review. *American Journal of Psychiatry*, 162(1): 12-24.
- CEVENINI, E., OSTAN, R., BUCCI, L., MONTI, D., FRANCESCHI, C. (2012), Stress, invecchiamento immunitario e infiammazione. In: BOTTACCIOLI F. (a cura di), *Stress e Vita. La scienza dello stress e la scienza della salute alla luce della Psiconeuroendocrinoimmunologia*, Tecniche Nuove, Milano.
- CHAMORRO-GARCÍA, R., SAHU, M., ABBEY, R.J., LAUDE, J., PHAM, N., BLUMBERG, B. (2013), Transgenerational inheritance of increased fat depot size, stem cell reprogramming and hepatic steatosis elicited by prenatal exposure to the obesogen tributyltin in mice. *Environ Health Perspect*, 121(3): 359-66.
- CHANG, H.S., ANWAY, M.D., REKOW, S.S., SKINNER, M.K. (2006), Transgenerational epigenetic imprinting of the male germ-line by endocrine disruptor exposure during gonadal sex determination. *Endocrinology*, 147(12): 5524-41.
- CHAO, W., D'AMORE, P. (2008), IGF2: Epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 19(2): 111-20.
- CHECKLEY, S. (1992), *Neuroendocrinology*. In: PAYKEL, E.S. ed. *Handbook of affective disorders*. Edinburgh: Chirchill Livingstone, 1992.

- CHEN, T.H., BOUCHER, B.J. (2006), Transgenerational effects of betel-quid chewing on the development of the metabolic syndrome in the Keelung Community-based Integrated Screening Program. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83: 688-92.
- CHRISTIANSON, A.L., CHESLER, J.G. (1994), Fetal valproate syndrome: clinical and neuro-developmental features in two sibling pairs. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 36: 361-9.
- CIARANELLO, A.L., CIARANELLO, R.D. (1995), The neurobiology of infantile autism. *Ann Rev Neurosci*, 18: 101-28.
- CLASS, Q.A., ABEL, K.M., KHASHAN, A.S., RICKERT, M.E., DALMAN, C., LARSSON, H. (2014), Offspring psychopathology following preconception, prenatal, and postnatal maternal bereavement stress. *Psychol Med*, 44(1): 71-84.
- COID, J.W., KIRKBRIDE, J.B., BARKER, D., COWDEN, F., STAMPS, C., YANG, M., JONES, P.B. (2008), Raised incidence rates of all psychoses among migrant groups: findings from the East London first episode psychosis study. *Archives of General Psychiatry*, 65(11): 1250-8.
- COOK, E.H., COURCHESNE, R.Y., COX, N.J., LORD, C., GONEN, D., GUTER, S.J., LINCOLN, A., NIX, K., HAAS, R., LEVENTHAL, B.L. (1988), Linkage-disequilibrium mapping of autistic disorder with 15q11-13 markers. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 62: 1077-83.
- COONEY, C.A., DAVE, A.A., WOLFF, G.L. (2002), Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *The Journal of Nutrition Health and Aging*, 132: 2393S-2400S.
- COOPER, C., KUH, D., EGGER, P., WADSWORTH, M., BARKER, D. (1996), Childhood growth and age at menarche. *Br J Obstet Gynaecol*, 103: 814-7.
- COOPER, C., JAVAID, M.K., TAYLOR, P., WALKER-BONE, K., DENNISON, E., ARDEN, N. (2002), The fetal origins of osteoporotic fracture. *Calcif Tissue Int*, 70: 391-4.
- COOPER, C., WALKER-BONE, K., ARDEN, N., DENNISON, E. (2000), Novel insights into the pathogenesis of osteoporosis: the role of intrauterine programming. *Rheumatology*, 39: 1312-5.
- COPELAND, D.H., SALMON, W.D. (1946), The occurrence of neoplasms in the liver lungs and other tissues of the rat as a result of prolonged choline deficiency. *American Journal of Pathology*, 22: 1059-79.

- CORDNER, Z.A. (2014), *Maternal High-fat Results in Cognitive Impairment and Hippocampal Gene Expression Changes in Rat Offspring*. In: Society for the Study of Ingestive Behavior, Seattle, WA, USA.
- COSTELLO, E.J., WORTHMAN, C., ERKANLI, A., ANGOLD, A. (2007), Prediction from low birth weight to female adolescent depression: a test of competing hypotheses. *Arch Gen Psychiatry*, 64(3): 338-44.
- CRAWLEY, J.N. (2007), Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. *Brain Pathol*, 17(4): 448-59.
- CRESSWELL, J.L., BARKER, D.J.P., OSMOND, C., EGGER, P., PHILLIPS, D.I.W., FRASER, R.B. (1997), Fetal growth, length of gestation and polycystic ovaries in adult life. *Lancet*, 350: 1131-5.
- CREWS, D., GORE, A.C., HSU, T.S., DANGLEBEN, N.L., SPINETTA, M., SCHALLERT, T., ANWAY, M.D., SKINNER, M.K. (2007), Transgenerational epigenetics imprints on mate preference. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(14): 5942-6.
- CREWS, D., GILLETTE, R., SCARPINO, S.V., MANIKKAM, M., SAVENKOVA, M.I., SKINNER, M.K. (2012), Epigenetic transgenerational inheritance of altered stress responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(23): 9143-8. doi: 10.173/pnas.1118514109
- CRICK, F. (1958), On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol*, 12: 138-63.
- CRICK, F. (1970), Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227: 561-3.
- CURHAN, G., CHERTOW, G.M., WILLETT, W.C., SPIEGELMAN, D., COLDITZ, G.A., MANSON, J.A.E. (1996), Birthweight and adult hypertension and obesity in women. *Circulation*, 94: 1310-5.
- CURHAN, G., WILLETT, W., RIMM, E., SPIEGELMAN, D., ASCHERIO, A., STAMPFER, M. (1996). Birthweight and adult hypertension, diabetes, mellitus and obesity in US men. *Circulation*, 94: 3246-50.
- DARWIN, C. (1859), *The origin of species*. (trad. it. *L'origine delle specie. Edizione integrale*. Newton Compton, Roma 2000).
- DAS, U.N. (2001), Is obesity an inflammation condition? *Nutrition*, 17(11-12): 953-66.
- DASKALAKIS, N.P., BAGOT, R.C., PARKER, K.J., VINKERS, C.H., DE KLOET, E.R. (2013), The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology*, 38(9): 1858-73.

- DASKALAKIS, N.P., LEHRNER, A., YEHUDA, R. (2013), Endocrine aspects of post-traumatic stress disorder and implications for diagnosis and treatment. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 42:503-13.
- DAUNCEY, M.J. (2013), Genomic and Epigenomic Insights into nutrition and brain disorders. *Nutrients*, 5: 887-914.
- DAWES, G.S., BORRUTO, F., ZACUTTI, A. (1990) (eds), *Fetal Autonomy and Adaptation*. Wiley: Chichester, 1990.
- DeBAUN, M.R., NIEMITZ, E.L., FEINBERG, A.P. (2009), Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *American Journal of Human Genetics*, 72: 156-60.
- DeCHIARA, T.M., ROBERTSON, E.J., EFSTRATIADIS, A. (1991), Parental imprinting of the mouse insuli-like growth factor II gene. *Cell*, 64: 849-59.
- DENNISON, E.M., ARDEN, N.K., KEEN, R.W., SYDDALL, H., DAY, I.N.M., SPECTOR, T.D., COOPER, C. (2001), Birthweight, vitamin D receptor genotype and the programming of osteoporosis. *Paed Perinat Epidemiol*, 15: 211-9.
- DEPINO, A.M. (2013), Peripheral and central inflammation in autism spectrum disorders. *Mol Cell Neurosci*, 53: 69-76.
- DICKE, J.M. (1987), *Poor obstetrical outcome*. In: PAVERSTEIN, C.J., ed. *Clinical obstetrics*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987: 421-39.
- DODDS, L., FELL, D.B., SHEA, S., ARMSON, B.A., ALLEN, A.C., BRYSON, S. (2011), The role of prenatal, obstetric and neonatal factors in the development of autism. *J Autism Dev Disord*, 41(7): 891-902.
- DOLINOY, D.C., WEIDMAN, J.R., WATERLAND, R.A., JIRTLE, R.L. (2006). Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ Health Perspectiv*, 114, 567-72.
- DOSHI, T., MEHTA, S.S., DIGHE, V., BALASINOR, N., VANAGE, G. (2011), Hypermethylation of estrogen receptor promoter region in adult testis of rats exposed neonatally to bisphenol A. *Toxicology*, 289(2-3): 74-82.
- DOUGLAS, M.R., JAMISON, D.C., ZEEBERG, B.R., GARFINKEL, M.D., WEINSTEIN, J.N., RASOULI, P., LU, X. (2008), Repeat-Containing Proteins (RCPs) Involved in Evolution. *Neuroendocrine Signaling and Cancer Front Neuroendocrinology*, 29(3): 428-44.

- DOVER, J., SCHNEIDER, J., TAWIAH-BOATENG, M.A., WOOD, A., DEAN, K., JOHNSTON, M., SHILATIFARD, A. (2002), Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 28368-71.
- DOYLE, P., BERAL, V., MACONOCHIE, N. (1992), Preterm delivery, low birthweight and small-for-gestational-age in live born singleton babies resulting from in-vitro fertilization. *Human Reproduction*, 7: 425-8.
- DULBECCO, R., VEZZONI, P. (a cura di) (1998), Il Progetto Genoma. *Le Scienze Quaderni*, 100/D.
- EKBOM, A., TRICHOPOULOS, D., ADAMI, H.O., HSIEH, C.C., LAN, S.J. (1992), Evidence of prenatal influences on breast cancer risk. *Lancet*, 340: 1015-9.
- ELBASHIR, S.M., LENDECKEL, W., TUSCHL, T. (2001a), RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development*, 15: 188-200.
- ELBASHIR, S.M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K., TUSCHL, T. (2001b), Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411: 494-8.
- ELLIOT, E., EZRA-NEVO, G., REGEV, L., NEUFELD-COHEN, A., CHEN, A. (2010), Resilience to social stress coincides with functional DNA methylation of the Crf gene in adult mice. *Nat Neurosci*, 13(11): 1351-3. doi: 10.1038/nn.2642
- ENGEL, G.L. (1977), The need for a new medical model: a challenge for biomedicine. *Science*, 196: 129-136.
- ERHARDT, S., SU, I.H., SCHNEIDER, R., BARTON, S., BANNISTER, A.J., PEREZ-BURGOS, L., JENUWEIN, T., KOUZARIDES, T., TARAKHOVSKY, A., SURANI, M.A. (2003), Consequences of the depletion of zygotic and embryonic enhancer of zeste 2 during preimplantation mouse development. *Development*, 130: 4235-48.
- ERIKSSON, J.G., FORSÉN, T., JADDOE, V.W.V., OSMOND, C., BARKER, D.J.P. (2002a), Effects of size at birth and childhood growth on the insulin resistance syndrome in elderly individuals. *Diabetologia*, 45: 342-8.
- ERIKSSON, J.G., FORSÉN, T., OSMOND, C., BARKER, D.J.P. (2003b), Pathways of infant and childhood growth that lead to type 2 diabetes. *Diabetic Care*, 26: 3006-10.
- ERIKSSON, J.G., FORSÉN, T., TUOMILEHTO, J., OSMOND, C., BARKER, D.J.P. (2001), Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *Br Med J*, 322: 949-53.



- ERIKSSON, J.G., FORSÉN, T., TUOMILEHTO, J., OSMOND, C., BARKER, D.J.P. (2003a), Early adiposity rebound in childhood and risk of type 2 diabetes in adult life. *Diabetologia*, 46: 190-4.
- FALL, C.H.D., VIJAYAKUMAR, M., BARKER, D.J.P., OSMOND, C., DUGGLEBY, S. (1995), Weight in infancy and prevalence of coronary heart disease in adult life. *BMJ*, 310: 17-9.
- FATEMI, S.H., STARY, J.M., EGAN, E.A. (2002), Reduced blood levels of reelin as a vulnerability factor in pathophysiology of autistic disorder. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 22: 139-52.
- FATEMI, S.H., SNOW, A.V., STARY, J.M., ARAGHI-NIKNAM, M., REUTIMAN, T.J., LEE, S., BROOKS, A.I., PEARCE, D.A. (2005), Reelin signaling is impaired in autism. *Biological Psychiatry*, 57: 777-87.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M.K., KOSTAS, S.A., DRIVER, S.E., MELLO, C.C. (1998), Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806-11.
- FISHER, R.E., STEELE, M., KARROW, A. (2012), Fetal programming of the neuroendocrine-immune system and metabolic disease. *J Pregnancy*, 2012: 792934. doi: 1155/2012/792934
- FLEGAL, K.M., CARROLL, M.D., KIT, B.K., OGDEN, C.L. (2012), Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA*, 307(5): 491-7.
- FODOR, J. (1983), *The Modularity of Mind: An Essay on Faculty Psychology*. MIT Press, Cambridge.
- FONDON, J.W., GARNER, H.R. (2004), Molecular origins of rapid and continuous morphological evolution. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 101: 18058-63.
- FORMAN, D., PIKE, M.C., DAVEY, G., DAWSON, S., BAKER, K., CHILVERS, C.E.D., OLIVER, R.T.D., COUPLAND, C.A.C. (1994), Aetiology of Testicular Cancer: Association with congenital abnormalities, age at puberty, infertility and exercise. *British Medical Journal*, 308(6941): 1393-1399.
- FORSÉN, T., ERIKSSON, J.G., TUOMILEHTO, J., REUNANEN, A., OSMOND, C., BARKER, D.J.P. (2000), The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Ann Int Med*, 133: 176-82.

- FRAGA, M.F., BALLESTAR, E., PAZ, M.F., ROPERO, S., SETIEN, F., BALLESTAR, M.L., HEINE-SUNER, D., CIGUDOSA, J.C., URIOSTE, M., BENITEZ, J., BOIX-CHORNET, M., SANCHEZ-AGUILERA, A., LING, C., CARLSSON, E., POULSEN, P., VAAG, A., STEPHAN, Z., SPECTOR, T.D., WU, Y.Z., PLASS, C., ESTELLER, M. (2005), Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102(30): 10604-9.
- FRANKEL, S., ELWOOD, P., SWEETNAM, P., YARNELL, J., SMITH, G.D. (1996), Birthweight, body-mass index in middle age and incident coronary heart disease. *Lancet*, 348: 1478-80.
- GADAMER, H.G. (1994), *Dove si nasconde la salute*. MUNARI L. (trad. it. a cura di), Ed. Cortina.
- GALE, C.R., MARTYN, C.N. (2004), Birth weight and later risk of depression in a national birth cohort. *Br J Psychiatry*, 184: 28-33.
- GAYLOR, D.W., NEUBRANDER, J.A. (2004), Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80: 1611-7.
- GILL, M.E., ERKEK, S., PETERS, A.H.F.M. (2012), Parental epigenetic control of embryogenesis: a balance between inheritance and reprogramming? *Curr Opin Cell Biol*, 24: 387-96.
- GLUCKMAN, P.D., HANSON, M.A. (2004), Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science*, 305: 1733-6.
- GLUCKMAN, P.D., HANSON, M.A., BUKLIJAS, T. (2009), A conceptual framework for the developmental origins of health and disease. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 1-13. doi: 10.1017/S2040174409990171
- GLUCKMAN, P.D., HANSON, M.A., SPENCER, H.G. (2005), Predictive adaptive responses and human evolution. *Trends Ecol Evol*, 20: 527-33.
- GLUCKMAN, P.D., HANSON, M.A., SPENCER, H.G., BATESON, P. (2005), Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies. *Proc Royal Soc Lond B*, 272: 671-77.
- GLUCKMAN, P.D., LILLYCROP, K.A., VICKERS, M.H. (2007), Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 12796-800.

- GOLD, J.D., PEDERSEN, R.A. (1994), Mechanisms of genomic imprinting in mammals. *Current Topics in Developmental Biology*, 29: 227-80.
- GOLDSTEIN, J.M., SEIDMAN, I.J., O'BRIEN, L.M., HORTON, N.J., KENNEDY, D.N., MAKRIS, N. (2002), Impact of normal sexual dimorphisms on sex differences in structural brain abnormalities in schizophrenia assessed by magnetic resonance imaging. *Arch Gen Psychiatry*, 59(2): 154-64.
- GOLL, M.G., KIRPEKAR, F., MAGGERT, K.A., YODER, J.A., HSIEH, C.L., ZHANG, X., GOLIC, K.G., JACOBSEN, S.E., BESTOE, T.H. (2006), Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 311(5759): 395-8.
- GOSDEN, R.G., FEINBERG, A.P. (2007), Genetics and epigenetics. Nature's pen-and-pencil set. *New England Journal of Medicine*, 356: 731-3.
- GRANGE, T., LOURENÇO E.E. (2011), *Mechanisms of epigenetic gene activation in disease: dynamics of DNA methylation and demethylation*. In ROACH, H.I., BRONNER, F., OREFFO, R.O.C., *Epigenetic aspects of chronic diseases*, Springer-Verlag, London 2011.
- GRAYSON, D.R., CHEN, Y., COSTA, E., DONG, E., GUIDOTTI, A., KUNDAKOVIC, M., SHARMA, R.P. (2006), The human reelin gene: transcription factors (+), repressors (-) and the methylation switch (+/-) in schizophrenia. *Pharmacol Ther*, 111(1): 272-86.
- GRAYSON, D.R., JIA, X., CHEN, Y., SHARMA, R.P., MITCHELL, C.P., GUIDOTTI, A., COSTA, E. (2005), Reelin promoter hypermethylation in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(26): 9341-6.
- GREENWOOD, C.E., WINOCUR, G. (2005), High-fat diets, insulin resistance and declining cognitive function. *Neurobiol Aging*, 26(suppl 1): 42-5.
- GREER, J.M., McCOMBE, P.A. (2012), The role of epigenetic mechanisms and processes in autoimmune disorders. *Biologics: Target and Therapy*, 6: 307-327.
- GRIZENCO, N., FORTIER, M.E., ZADOROZNY, C., THAKUR, G., SCHMITZ, N., DUVAL, R. (2012), Maternal stress during pregnancy, ADHD symptomatology in children and genotype: gene environment interaction. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*, 21(1): 9-15.
- GUO, J.U. (2013), *Active DNA Demethylation and 5-Hydroxymethylcytosine*. In: SWEATT, J.D., MEANEY, M.J., NESTLER, E.J., AKBARIAN S., *Epigenetic regulation in the nervous system*. Academic Press, Elsevier, Amsterdam, cap. 3.
- HALES, C.N., BARKER, D.J.P. (1992), Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, 35: 595-601.

- HALES, C.N., BARKER, D.J.P., CLARK, P.M.S., COX, L.J., FALL, C., OSMOND, C., WINTER, P.D. (1991), Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*, 303: 1019-22.
- HANSEN, M., KURINCZUK, J.J., BOWER, C., WEBB, S. (2002), The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *The New England Journal of Medicine*, 346: 725-30.
- HANSON, M.A., GLUCKMAN, P.D. (2005), Developmental processes and the induction of cardiovascular function: conceptual aspects. *J Physiol*, 565: 27-34.
- HANSON, M.A., GLUCKMAN, P.D. (2008), Developmental origins of health and disease: new insights. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 102(2): 90-3.
- HARK, A.T., SCHOENHERR, C.J., KATZ, D.J., INGRAM, R.S., LEVORSE, J.M., TILGHMAN, S.M. (2000), CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature*, 405: 486-9.
- HARTL, F.U. (1996), Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381: 571-80.
- HEIJMANS, B.T., TOBI, E.W., STEIN, A.D., PUTTER, H., BLAW, G.J., SUSSER, E.S., SLAGBOOM, P.E., LUMEY, L.H. (2008), Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(44):17046-9.
- HERBSTMAN, J.B., TANG, D., ZHU, D. (2012), Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo(a)pyrene-DNA adducts and genomic DNA methylation in cord blood. *Environ Health Perspect*, 120(5): 733-8.
- HITCHINS, M.P., WONG, J.J., SUTHERS, G., SUTER, C.M., MARTIN, D.I., HAWKINS, N.J., WARD, R.L. (2007), Inheritance of a cancer-associated *MLH1* germ-line epimutation. *The New England Journal of Medicine*, 356(7): 697-705.
- HITCHINS, M.P., WARD, R.L. (2007b), Germ-line epimutation of *MLH1* in individuals with multiple cancers. *Nature Genetic*, 39: 1414.
- HIURA, H., OKAE, H., MIYAUCHI, N., SATO, F., SATO, A., VAN DE PETTE, M., JOHN, R.M., KAGAMI, M., NAKAI, K., SOEJIMA, H., OGATA, T., ARIMA, T. (2012), Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. *Human Reproduction*, 27(8): 2541-8.
- HOLLICK, J.B., DORWEILER, J.E., CHANDLER, V.L. (1997), Paramutation and related allelic interactions. *Trends Genetics*, 13(8): 302-8.

- HOLLIDAY, R., PUGH, J.E. (1975), DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187: 226-32.
- HOLLOWAY, T., MORENO, J.L., UMALI, A., RAYANNAVAE, V., HODES, G.E., RUSSO, S.J (2013), Prenatal stress induced schizophrenia-like alterations of serotonin 2A and metabotropic glutamate 2 receptors in the adult offspring: role of maternal immune system. *J Neurosci*, 33(3): 1088-98.
- HOTCHKISS, R.D. (1948), The quantitative separation of purines, pyrimidines and nucleosides by paper chromatography. *Journal of Biological Chemistry*, 175: 315-32.
- HOWITZ, K.T., BITTERMAN, K.J., CHOEN, H.Y., LAMMING, D.W., LAVU, S. (2003), Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425: 191-6.
- HUGH, D.M., FATIMA, S., KELLY, G., WENDY, D., WOLF, R. (2005), Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics*, 14, Review Issue, I: R47-R58.
- HUI, L., HUANG, J., WANG, J., JIANG, S., BAILEY, A.S., GILDMAN, D.C., WELCKER, M., BEDELL, V., SLOVAK, M.L., CLURMAN, B., THAYER, M., FLEMING, W.H., EPNER, E. ( 2008), Transvection mediated by the translocated cyclin D1 locus in mantle cell lymphoma. *Journal of Experimental Medicine*, 205(8): 1843-58.
- HUNTER, R.G., MCCARTHY, K.J., MILNE, T.A., PFAFF, D.W., McEWEN, B.S. (2009), Regulation of hippocampal H3histone methylation by acute and chronic stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(49): 20912-7. doi: 10.1073/pnas.0911143106
- HUTTUNEN, M.O., NISKANEN, P. (1978), Prenatal loss of father and psychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry*, 35(4): 429-31.
- HUXLEY, R., NEIL, A., COLLINS, R. (2002), Unravelling the fetal origins hypothesis: is there really an inverse association between birthweight and subsequent blood pressure? *Lancet*, 360: 659-65.
- HYPPÖNEN, E., LEON, D.A., KENWARD, M.G., LITHELL, H. (2001), Prenatal growth and risk of occlusive and haemorrhagic stroke in Swedish men and women born 1915-29: historical cohort study. *BMJ*, 323: 1033-4.
- INGROSSO, D., CIMMINO, A., PERNA, A.F., MASELLA, L., DE SANTO, N.G., DE BONIS, M.L., VACCA, M., D'ESPOSITO, M., D'URSO, M., GALLETTI, P. (2003), Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia. *Lancet*, 361: 1693-9.
- JAASKELAINEN, T., MAKKONEN, H., PALVIMO, J.J. (2011), Steroid up-regulation of FKBP5 and its role in hormone signaling. *Current Opinion in Pharmacology*, 11:326-31.

- JACOB, F., MONOD, J. (1961), Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 3: 318-56.
- JAMES, S.J., POGRIBNY, I.P., POGRIBNA, M., MILLER, B.J., JERNIGAN, S., MELNYK, S. (2003), Mechanisms of DNA Damage, DNA Hypomethylation and Tumor Progression in the Folate/Methyl-Deficient Rat Model of Hepatocarcinogenesis, *The Journal of Nutrition*, 3: 3740S-3747S.
- JANESICK, A., BLUMBERG, B. (2011), Minireview: PPARgamma as the target of obesogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 127(1-2): 4-8.
- JANESICK, A., BLUMBERG, B. (2012), Obesogens, stem cells and the developmental programming of obesity. *Int J Androl*, 35(3): 437-48.
- JEFFERIS, B.J.M.H., POWER, C., HERTZMAN, C. (2002), Birth weight, childhood socioeconomic environment and cognitive development in the 1958 British birth cohort study. *BMJ*, 325: 305-11.
- JEFFERSON, W.N., COUSE, J.F., PADILLA-BANKS, E., KORACH, K.S., NEWBOLD, R.R. (2002), Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER) alpha expression and multioocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ER beta-mediated and non-estrogenic actions. *Biol Reprod*, 67(4): 1285-1296.
- JOHNSON, G.D., LALANCETTE, C., LINNEMANN, A.K., LEDUC, F., BOISSONNEAULT, G., KRAWETZ, S.A. (2011), The sperm nucleus: Chromatin, RNA and the nuclear matrix. *Reproduction*, 141(1): 21-36.
- JOHNSON, T.B., COGHILL, R.D. (1925), Researches on pyrimidines. C111, The discovery of 5-methylcytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle bacillus. *Journal American Chemical Society*, 47:2838-44.
- JONATHAN, D., WREN, J.D., GARNER, R.H. (2005), Data-Mining Analysis Suggests an Epigenetic Pathogenesis for Type 2 Diabetes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2: 104-12.
- JONES, P.A. (2002), DNA methylation and cancer. *Oncogene*, 21: 5358-60.
- KAATI, G., BYGREN, L.O., PEMBREY, M., SJÖSTRÖM, M. (2007), Transgenerational response to nutrition, early-life circumstances and longevity. *European Journal of Human Genetics*, 15(7): 784-90.
- KALIMAN, P., ALVAREZ-LÓPEZ, M.J., COSÍN-TOMÁS, M., ROSENKRANZ, M.A., LUTZ, A., DAVIDSON, R.J. (2014), Rapid changes in histone deacetylases and

- inflammatory gene expression in expert meditators. *Psychoneuroendocrinology*, 40: 96-107. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.11.004
- KAMSTRA, J.H., HRUBA, E., BLUMBERG, B. (2014), Transcriptional and epigenetic mechanisms underlying enhanced in vitro adipocyte differentiation by the brominated flame retardant BDE-47. *Environ Sci Technol*, 48(7): 4110-9.
- KANNISTO, V., CHRISTENSEN, K., VAUPEL, J.W. (1997), No increased mortality in later life for cohorts born during famine. *Am J Epidemiol*, 145: 987-94.
- KENDLER, K.S., KARKOWSKI-SHUMAN, L., WALSH, D. (1996), Age at onset in schizophrenia and risk of illness in relatives. Results from the Roscommon Family Study. *British Journal of Psychiatry*, 169(2): 213-8.
- KHASHAN, A.S., ABEL, K.M., McNAMEE, R., PEDERSEN, M.G., WEBB, R.T., BAKER, P.N. (2008), Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Arch Gen Psychiatry*, 65(2): 146-52.
- KIM, D.R., BALE, T.L., EPPERSON, C.N. (2015), Prenatal Programming of Mental Illness: Current Understanding of Relationship and Mechanisms. *Curr Psychiatry Rep*, 17(2): 5. doi: 10.1007/s11920-014-0546-9.
- KIM, J., GUERMAH, M., McGINTY, R.K., LEE, J.S., TANG, Z., MILNE, T.A., SHILATIFARD, A., MUIR, T.V., ROEDER, R.G. (2009), RAD6-Mediated transcription coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells. *Cell*, 137: 459-71.
- KIRCHNER, S., KIEU, T., CHOW, C., CASEY, S., BLUMBERG, B. (2010), Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. *Mol Endocrinol*, 24(3): 526-39.
- KLENGEL, T., MEHTA, D., ANACKER, C., REX-HAFFNER M., PRUESSNER, J.C., PARIANTE, C.M. (2013), Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions. *Nature neuroscience*, 16:33-41.
- KLENOVA, E.M., MORSE, H.C., OHLSSON, R., LOBANENKOV, V.V. (2002), The novel BORIS+CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 12: 399-414.
- KOENEN, K.C., UDDIN, M. (2010), FKBP5 polymorphisms modify the effects of childhood trauma. *Neuropsychopharmacology*, 35: 1623-4.
- KOENIG, J.I., ELMER, G.I., SHEPARD, P.D., LEE, P.R., MAYO, C., JOY, B., HERCHER, E., BRADY, D.L. (2005), Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits

- behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. *Behav Brain Res*, 156(2): 251-61.
- KOPELOVICH, L., CROWELL, J.A., FAY, J.R. (2003), The Epigenome as a Target for Cancer Chemoprevention. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 95, N° 23, December 3.
- KRAKOWIAK, P., WALKER, C.K., BREMER, A.A., BAKER, A.S., OZONOFF, S., HANSEN, R.L. (2012), Maternal metabolic conditions and risk for autism and other neurodevelopmental disorders. *Pediatrics*, 129(5): e1121-8.
- KRUMDIECK, C.L. (1983), *Role of folate deficiency in carcinogenesis*. In: BUTTERWORTH, C.E. & HUTCHENSON, M.L., *Nutritional factors in the induction and maintenance of malignancy*, pp. 225-245, Academic Press, New York.
- KUCHARSKI, R., MALESZKA, J., FORET, S., MALESZKA, R. (2008), Nutritional Control of Reproductive Status in Honeybees via DNA Methylation. *Science*, 319: 1827-30.
- KUZAWA, C.W. (2005), Fetal origins of developmental plasticity: are fetal cues reliable predictors of future nutritional environments? *Am J Hum Biol*, 17: 5-21.
- KUZAWA, C.W., GLUCKMAN, P.D., HANSON, M.A., FANTUZZI, G., MAZZONE, T. (2007), *Developmental perspectives on the origin of obesity*. In: FANTUZZI, G., MAZZONE, T. eds. *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease*. pp. 207-19. Humana Press: Totowa, NJ, 2007.
- KYLE, U.G., PICHARD, C. (2006), The Dutch famine of 1944-1945: a pathophysiological model of long-term consequences of wasting disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 9: 388-94.
- LAM, L.L., EMBERLY, E., FRASER, H.B., NEUMANN, S.M., CHEN, E., MILLER, G.E., KOBOR, M.S. (2012), Factors underlying variable DNA methylation in a human community cohort. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109 Suppl 2: 17253-60.
- LAMARCK, J.B. (1809), *Philosophie zoologique* (ed. it. *Filosofia zoologica*, La Nuova Italia, Firenze, 1976).
- LAMARTINIERE, C.A., COTRONEO, M.S., FRITZ, W.A., MENTOR, J.W., MARCEL, R., ELGAVISH, A. (2002), Genistein chemoprevention: timing and mechanism of action in murine mammary and prostate. *Journal of Nutrition*, 132: 552S-558S.
- LA PLANT, (2010), Dnmt3 regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci*, 13(9): 1137-43. doi: 10.1038/nn.2619



- LAUKKANEN, M.O., MANNERMAA, S., HILTUNEN, M.O. (1999), Local hypomethylation in atherosclerosis found in rabbit *ec-sod* gene. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 19: 2171-8.
- LAW, C.M., DE SWIET, M., OSMOND, C., FAYERS, P.M., BARKER, D.J.P., CRUDDAS, A.M. (1993), Initiation of hypertension in utero and its amplification throughout life. *BMJ*, 306: 24-7.
- LEE, H.P., GOURLEY, L., DUFFY, S.W., ESTEVE, J., LEE, J., DAY, N.E. (1991), Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet*, 337: 1197-200.
- LEHRNER, A., BIERER, L.M., PASSARELLI, V., PRATCHETT, L.C., FLORY, J.D., BADER, H.N. (2014), Maternal PTSD associates with greater glucocorticoid sensitivity in offspring of Holocaust survivors. *Psychoneuroendocrinology*, 40: 213-20.
- LEI, H., OH, S.P., OKANO, M., JÜTTERMANN, R., GOSS, K.A., JAENISCH, R., LI, E. (1996), De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development*, 122: 3195-205.
- LEON, D., KOUPILOVÁ, I. (2001), *Birth weight, blood pressure and hypertension. Epidemiological studies*. In: BARKER, D.J. ed., *Fetal origins of cardiovascular and lung disease*. New York and Basel: Marcel Dekker, 2001.
- LEON, D., KOUPILOVÁ, I., LITHELL, H.O., BERGLUND, L., MOHSEN, R., VÅGERÖ, D. (1996), Failure to realise growth potential in utero and adult obesity in relation to blood pressure in 50 years old Swedish men. *BMJ*, 312: 401-6.
- LEON, D.A., LITHELL, H.O., VAGERO, D., KOUPILOVA, I., MOHSEN, R., BERGLUND, L. (1998), Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15000 Swedish men and women born 1915-29. *BMJ*, 317: 241-5.
- LEPAGE, J.F., HONG, D.S., MAZAIKA, P.K., RAMAN, M., SHEAU, K., MARZELLI, M.J., HALLMAYER, J., REISS, A.L. (2013), Genomic imprinting effects of the X chromosome on brain morphology. *Journal of Neuroscience*, 33(19): 8567-74.
- LEWIS, E.B. (1954), The theory and application of a new method of detecting chromosomal rearrangements in *Drosophila melanogaster*. *American Naturalist*, 88: 225-39.
- LI, C., VAGIN, V.V., LEE, S., XU, J., MA, S., XI, H., SITZ, H., HORWICH, M., SYRZYCKA, D., HONDA, B.M., KITTLER, E.L., ZAPP, M.L., KLATTENHOFF, C., SCHULZ, N., THEURKAUF, W.E., WENG, Z., ZAMORE, P.D. (2009), Collapse of germ-line piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies. *Cell*, 137: 509-21.

- LI, E., BESTOR, T.H., JAENISCH, R. (1992), Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69: 915-26.
- LI, Y., LUH, C.J., BURNS, K.A. (2013), Endocrine-disrupting chemicals (EDCs): in vitro mechanism of estrogenic activation and differential effects on ER target genes. *Environ Health Perspect*, 121(4): 459-66.
- LILLYCROP, K.A., PHILLIPS, E.S., JACKSON, A.A., HANSON, M.A., BURDGE, G.C. (2005), Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr*, 135: 1382-6.
- LILLYCROP, K.A., SLATER-JEFFERIES, J.L., HANSON, M.A. (2007), Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. *Br J Nutr*, 97: 1064-73.
- LINDEN, R., MARTINS, V.R., PRADO, M.A., CAMMAROTA, M., IZQUIERDO, I., BRENTANI, R.R. (2008), Physiology of the prion proteins. *Physiological Review*, 88(2): 673-728.
- LING, C., DEL GUERRA, S., LUPI, R., RONN, T., GRANHALL, C., LUTHMAN, H., MASIELLO, P., MARCHETTI, P., GROOP, L., DEL PRATO, S. (2008), Epigenetic regulation of PPARGC1A in Human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. *Diabetologia*, 51: 615-22.
- LITHELL, H.O., McKEIGUE, P.M., BERGLUND, L., MOHSEN, R., LITHELL, U.B., LEON, D.A. (1996), Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50-60 years. *BMJ*, 312: 406-10.
- LIU, H., KIM, J.M., AOKI, F. (2004), Regulation of Histone H3lysine 9 methylation in oocytes and early pre-implantation embryos. *Development*, 131: 2269-80.
- LOHI, H., YOUNG, E.J., FITZMAURICE, S.N., RUSBRIDGE, C., CHAN, E.M., VERVOORT, M., TURNBULL, J., ZHAO, X.C., IANZANO, L., PATERSON, A.D., SUTTER, N.B., OSTRANDER, E.A., ANDRE, C., SHELTON, G.D., ACKERLEY, C.A., SCHERER, S.W., MINASSIAN, B.A. (2005), Expanded repeat in canine epilepsy. *Science*, 307: 81.
- LOUKINOV, D.I., PUGACHEVA, E., VATOLIN, S. (2002), *BORIS*, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with *CTCF*, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 6806-11.

- LUCAS, A. (1991), *Programming by early nutrition in man*. In: BOCK, G.R., WHELAN, J., eds. *The childhood environment and adult disease*. Chichester: John Wiley, 1991: 38-55.
- LUND, G., ANDERSSON, L., LAURIA, M. (2004), DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein. *European Journal of Biological Chemistry*, 279: 29147-54.
- LUKASZEWSKI, M.A., EBERLE, D., VIEAU, D., BRETON, C. (2013), Nutritional manipulations in the perinatal period program adipose tissue in offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 305: E1195-E1207. doi: 10.1152/ajpendo.00231.2013
- LUO, J., NIKOLAEV, A.Y., IMAI, S., CHEN, D., SU, F. (2001), Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*, 107: 137-48.
- LURIA, S.E. (1960), Viruses, cancer cells and the genetic concept of virus infection. *Cancer Res.*, 20: 677-88.
- LURIA, S.E., DELBRÜCK, M. (1943), Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, 28: 491-511.
- LYKO, F., RAMSAHOYE, B.H., JAENISCH, R. (2000), DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 408(6812): 538-40.
- LYON, M.F. (1961), Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, 190: 372-3.
- MACKAY, D.J., CALLAWAY, J.L., MARKS, S.M., WHITE, H.E., ACERINI, C.L., BOONEN, S.E., DAYANIKLI, P., FIRTH, H.V., GOODSHIP, J.A., HAEMERS, A.P., HAHNEMANN, J.M., KORDONOURI, O., MASOUD, A.F., OESTERGAARD, E., STORR, J.S., ELLARD, G., HATTERSLEY, A.T., ROBINSON, D.O., TEMPLE, I.K. (2008), Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in *ZFP57*. *Nature Genetics*, 40: 949-51.
- MacLAUGHLIN, S.M., WALKER, S.K., ROBERTS, C.T., KLEEMANN, D.O., McMILLEN, I.C. (2005), Periconceptional nutrition and the relationship between maternal body weight changes in the periconceptional period and foeto-placental growth in the sheep. *J Physiol*, 565: 111-24.
- MANIKKAM, M., HAQUE, M.M., GUERRERO-BOSAGNA, C., NILSSON, E.E., SKINNER, M.K. (2014), Pesticide methoxychlor promotes the epigenetic transgenerational inheritance of adult-onset disease through the female germ-line. *PLoS One*, 9(7): e102091.
- MANIKKAM, M., TRACEY, R., GUERRERO-BOSAGNA, C., SKINNER, M.K. (2013), Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic

- transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PLoS One*, 8(1): e55387.
- MANSUY, I.M. (2013), *Transgenerational inheritance in mammals*. In: SWEATT, J.D., MEANEY, M.J., NESTLER, E.J., AKBARIAN S., *Epigenetic regulation in the nervous system*, Academic Press, Elsevier, Amsterdam, cap. 3.
- MARTÍNEZ, J.A., CORDERO, P., CAMPIÓN, J., MILAGRO, F.I. (2012), Interplay of early-life nutritional programming on obesity, inflammation and epigenetic outcomes. *Proc Nutr Soc*, 71: 276-83. doi: 10.1177/S0029665112000055
- MARTTILA, S., JYLHÄVÄ, J., NEVALAINEN, T., NYKTER, M., JYLHÄ, M., HERVONEN, A., TSEREL, L., PETERSON, P., HURME, M. (2013), Transcriptional analysis reveals gender-specific changes in the aging of the human immune system. *PLoS One*, 8(6): e66229. doi: 10.1371/journal.pone.0066229
- MATRISCIANO, F., TUETING, P., DALAL, I., KADRIU, B., GRAYSON, D.R., DAVIS, J.M. (2013), Epigenetic modifications of GABAergic interneurons are associated with the schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice. *Neuropharmacology*, 68: 184-94.
- McCANCE, D.R., PETTITT, D.J., HANSON, R.L., JACOBSSON, L.T.H., KNOWLER, W.C., BENNETT, P.H. (1994), Birthweight and non-insulin dependent diabetes: thrifty genotype, thrifty phenotype or surviving baby genotype? *BMJ*, 308: 942-8.
- McEWEN, B.S., EILAND, L., HUNTER, R.G., MILLER, M.M. (2012), Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology*, 62(1): 3-12.
- McGOWAN, P.O., MEANEY, M., SZYF, M. (2008), Diet and the epigenetic reprogramming of phenotypic differences in behavior. *Brain Research*, 1237: 12-24.
- McKEE, B.D. (2004), Homologous pairing and chromosome dynamics in meiosis and mitosis. *Biochim Biophys Acta*, 1677(1-3): 165-80.
- MEANEY, M.J. (2001), Maternal care, gene expression and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience*, 24:161-9.
- MEANEY, M.J., SZYF, M. (2005), Maternal care as a model for experience-dependent chromatin plasticity? *Trends Neuroscience*, 28: 456-63.
- MEEHAN, R.R., LEWIS, J.D., McKAY, S., KLEINER, E.L., BIRD, A.P. (1989), Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell*, 58: 499-507.

- MEEHAN, R.R., LEWIS, J.D., BIRD, A.P. (1992), Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Research*, 20: 5085-92.
- MENGEL-FROM, J., THINGGAARD, M., CHRISTIANSEN, L., VAUPEL, J.W., ORSTAVIK, K.H., CHRISTENSEN, K. (2012), Skewed X inactivation and survival: a 13-year follow-up study of elderly twins and singletons. *European Journal of Human Genetics*, 20(3): 361-4.
- MENKE, A., KLENGEL, T., RUBEL, J., BRUCKL, T., PFISTER, H., LUCAE, S. (2013), Genetic variation in FKBP5 associated with the extent of stress hormone dysregulation in major depression. *Genes, brain and behavior*, 12:289-96.
- MEYER, U., FELDON, J. (2010), Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Prog Neurobiol*, 90(3): 285-326.
- MICHELS, K.B., TRICHOPOULOS, D., ROBINS, J.M., ROSNER, B.A., MANSON, J.E., HUNTER, D.J. (1996), Birthweight as a risk factor for breast cancer. *Lancet*, 348: 1542-6.
- MIGEON, B.R. (2007), *Females are mosaics. X inactivation and sex differences in disease*. Oxford University Press, Oxford.
- MIKOL, Y.B., HOOVE, K.L., CREASIA, D., POIRIER, L.A. (1983), Hepatocarcinogenesis in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis*, 4: 1619-29.
- MIRZA, S., SHARMA, G., PARSHAD, R., GUPTA, S.D., PANDYA, P., RALHAN, R. (2013), Expression of DNA methyltransferases in breast cancer patients and to analyze the effect of natural compounds on DNA methyltransferases and associated proteins. *J Breast Cancer*, 16(1): 23-31.
- MONK, M. (1988), Genomic imprinting. *Genes & Development*, 2: 921-5.
- MONOD, J. (1970), *Le hasard et la nécessité. Essai sur la philosophie naturelle de la biologie moderne*. Editions du Seuil, Paris (trad. it.: *Il caso e la necessità. Saggio sulla filosofia naturale della biologia contemporanea*. Mondadori, Milano 1971).
- MORGAN, H.D., SUTHERLAND, H.G., MARTIN, D.I., WHITELAW, E. (1999), Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nature Genetics*, 23: 314-8.
- MORGAN, H.D., SANTOS, F., GREEN, K., DEAN, W., REIK, W. (2005), Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics*, 14: R47-R58.
- MULLER, J., KASSIS, J.A. (2006), Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in *Drosophila*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16(5): 476-84.

- MUNTJEWERFF, J.W., KAHN, R.S., BLOM, H.J., DEN HEIJER, M. (2006), Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase and risk of schizophrenia: a meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, 11: 143-9.
- MUSKIET, F.A., KEMPERMAN, R.F. (2006), Folate and longchain polyunsaturated fatty acids in psychiatric disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17: 717-27.
- MYHRMAN, A., RANTAKALLIO, P., ISOHANNI, M., JONES, P., PARTANEN, U. (1996), Unwantedness of a pregnancy and schizophrenia in the child. *Br J Psychiatry*, 169(5): 637-40.
- MYZAK, M.C., RONG, K.H., WANG, R., DASHWOOD, H., HO, E. (2006), Sulforaphane inhibits histone deacetylase activity in BPH-1, LnCaP and PC-3 prostate epithelial cells. *Carcinogenesis*, 27: 811-9.
- NAKAJIMA, K., TAKEOKA, M., MORI, M., HASHIMOTO, S., SAKURAI, A., NOSE, H., HIGUCHI, K., ITANO, N., SHIOHARA, M., OH, T., TANIGUCHI, S. (2010), Exercise effects on methylation of ASC gene. *Int J Sports Med*, 31(9): 671-5.
- NAN, X., NG, H.H., JOHNSON, C.A., LAHERTY, C.D., TURNER, B.M., EISENMAN, R.N., BIRD, A. (1998), Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a Histone deacetylase complex. *Nature*, 393: 386-9.
- NANNEY, D.L. (1958), Epigenetic control systems. *Proceeding of National Academy of Science USA*, 44(7): 712-7.
- NAPOLI, C., LEMIEUX, C., JORGENSEN, R. (1990), Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes. *Plant Cell*, 2: 279-89.
- NATURE REPRINT COLLECTION (2013), *MicroRNAs from bench to clinic*.
- NERI, G., GENUARDI, M. (2010). *Genetica Umana e Medica*. Edra Masson, Milano.
- NEWBERNE, P.M. (1986), *Lipotropic factors and oncogenesis. Essential nutrients in carcinogenesis*. In: POIRIER, L.A., NEWBERNE, P.M., PARIZA, M.W. eds. pp. 223-51, Plenum Press, New York.
- NG, S.S., YUE, W.W., OPPERMANN, U., KLOSE, R.J. (2009), Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell Mol Life Sci*, 66(3): 407-22.
- NIU, S., RENFRO, A., QUATTROCCHI, C.C., SHELDON, M., D'ARCANGELO, G. (2004), Reelin promotes hippocampal dendrite development through the VLDLR/ApoER2Dab1 pathway. *Neuron*, 41(1): 71-84.

- OATES, N.A., VAN VLIET, J., DUFFY, D.L., KROES, H.Y., MARTIN, N.G., BOOMSMA, D.I., CAMPBELL, M., COULTHARD, M.G., WHITELAW, E., CHONG, S. (2006), Increased DNA methylation at the AXIN1 gene in monozygotic twin from a pair discordant for a caudal duplication anomaly. *American Journal of Human Genetic*, 79(1): 155-62.
- ÖDEGAARD, O. (1932), Emigration and insanity: a study of mental disease among the Norwegian-born population of Minnesota. *Acta Psychiatr Neurol Scand*, (Suppl 4): 1-206.
- O'DONNELL, K.J., BUGGE JENSEN, A., FREEMAN, L., KHALIFE, N., O'CONNOR, T.G., GLOVER, V. (2012), Maternal prenatal anxiety and down-regulation of placental 11beta-HSD2. *Psychoneuroendocrinology*, 37(6): 818-26.
- O'DONNELL, K., GLOVER, V., JENKINS, J., BROWNE, D., BEN-SHLOMO, Y., GOLDING, J. (2013), Prenatal maternal mood is associated with altered diurnal cortisol in adolescence. *Psychoneuroendocrinology*, 38(9): 1630-8.
- O'DONNELL, K., O'CONNOR, T.G., GLOVER, V. (2009), Prenatal stress and neurodevelopment of the child: focus on the HPA axis and role of the placenta. *Dev Neurosci*, 31(4): 285-92.
- OHLSSON, R., RENKAWITZ, R., LOBANENKOV, V. (2001), CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends in Genetic*, 17: 520-7.
- OLAHARSKI, A.J., RINE, J., MARSHALL, B.L., BABIARZ, J., ZHANG, L., VERDIN, E., SMITH, M.T. (2005), The flavoring Agent Dihydrocoumarin Reverses Epigenetic Silencing and Inhibits Sirtuin Deacetylases. *PLoS Genetics*, 1(6): e67-e77.
- ONG, K.K., PHILLIPS, D.I., FALL, C. (1999), The insulin gene VNTR, type 2 diabetes and birth weight. *Nature Genetic*, 21: 262-3.
- OOI, S.L., HENIKOFF, S. (2006), Germ-line histone dynamics and epigenetics. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(3): 257-65.
- OSMOND, C., BARKER, D.J.P., WINTER, P.D., FALL, C.H.D., SIMMONDS, S.J. (1993), Early growth and death for cardiovascular disease in women. *BMJ*, 307: 1519-24.
- OZGYIN, L., ERDÖS, E., BOJCSUK, D., BALINT, B.L. (2015), Nuclear receptors in transgenerational epigenetic inheritance. *Prog Biophys Mol Biol*, 118(1-2): 34-43.
- PAGANETTO, G., AIELLO, V. (2013), *Introduzione all'epidemiologia epigenetica*. Aracne ed., Roma.

- PAINTER, R.C., OSMOND, C., GLUCKMAN, P., HANSON, M., PHILLIPS, D.I., ROSEBOOM, T.J. (2008), Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *BJOG*, 115: 1243-9. doi: 10.1111/j.1471-0528.2008.01822.x
- PAINTER, R.C., ROSEBOOM, T.J., BLEKER, O.P. (2005), Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod Toxicol*, 20: 345-52.
- PANETH, N., SUSSER, M. (1995), Early origins of coronary heart disease (the “Barker hypothesis”). *BMJ*, 310: 411-2.
- PARK, J.H., STOFFERS, D.A., NICHOLLS, R.D., SIMMONS, R.A. (2008), Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J Clin Invest*, 118: 2316-24.
- PATEL, A., MacMAHON, S., CHALMERS, J., NEAL, B., BILLOT, L., WOODWARD, M., MARRE, M., COOPER, M., GLASZIOU, P., GROBBEE, D., HAMET, P., HARRAP, S., HELLER, S., LIU, L., MANCIA, G., MOGENSEN, C.E., PAN, C., POULTER, N., RODGERS, A., WILLIAMS, B., BOMPOINT, S., DE GALAN, B.E., JOSHI, R., TRAVERT, F. (2008), Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 358: 2560-72.
- PAPOUTSIS, A.J., SELMIN, O.I., BORG, J.L., ROMAGNOLO, D.F. (2013), Gestational exposure to the AhR agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces BRCA-1 promoter hypermethylation and reduces BRCA-1 expression in mammary tissue of rat offspring: Preventive effects of resveratrol. *Mol Carcinog*, 54(4): 261-9. doi: 10.1002/mc.22095
- PAVLOV, D. (1965), *Leningrad, 1941: the blockade*. Chicago: University of Chicago Press, 1965.
- PEMBREY, M.E. (1996), Imprinting and transgenerational modulation of gene expression; Human growth as a model. *Acta Geneticae Medicae et gemellologiae*, 45: 111-25.
- PEMBREY, M.E., BYGREN, L.O., KAATI, G., EDVINSSON, S., NORTHSTONE, K., SJOSTROM, M., GOLDING, J. (2006) Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *European Journal of Human Genetics*, 14: 159-66.
- PETRONIS, A., GOTTESMAN, I.I., KAN, P., KENNEDY, J.L., BASILE, V.S., PATERSON, A.D., POPENDIKYTE, V. (2003), Monozygotic twins exhibit numerous epigenetic differences: clues to twin discordance? *Schizopr Bull*, 29(1): 169-78.
- PHILLIPS, D.I.W., BARKER, D.J.P., HALES, C.N., HIRST, S., OSMOND, C. (1994), Thinness at birth and insulin resistance in adult life. *Diabetologia*, 37: 150-4.



- PHILLIPS, D.I.W., WALKER, B.R., REYNOLDS, R.M., FLANAGAN, D.E., WOOD, P.J., OSMOND, C., BARKER, D.J.P., WHORWOOD, C.B. (2000), Low birth weight predicts elevated plasma cortisol concentrations in adults from 3 population. *Hypertension*, 35: 1301-6.
- PICKER, J.D., COYLE, J.T. (2005), Do maternal folate and homocysteine levels play a role in neurodevelopmental processes that increase risk for schizophrenia? *Harvard Review of Psychiatry*, 13: 197-205.
- PRATT, W.B., TOFT, D.O. (1997), Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Reviews*, 18:306-60.
- PUIGSERVER, P., SPIEGELMAN, B.M. (2003), Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional co-activator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews*, 24: 78-90.
- PUSCHENDORF, M., TERRANOVA, R., BOUTSMA, E., MAO, X., ISONO, K., BRYKCZYNSKA, U., KOLB, C., OTTE, A.P., KOSEKI, H., ORKIN, S.H., VAN LOHUIZEN, M., PETERS, A.H. (2008), PRC1 and Suv39h specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos. *Nat Genet*, 40: 411-20.
- PUTNAM, H. (1975), *Mind, language and reality*. Cambridge University Press, Cambridge.
- QUEITSCH, C., SANGSTER, T.A., LINDQUIST, S. (2002), Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature*, 417: 618-24.
- RAKYAN, V., WHITELOW, E. (2003), Transgenerational epigenetic inheritance. *Current Biology*, 13: R6.
- RANDY, L.J., SKINNER, M.K. (2007), Environmental Epigenomics and Disease Susceptibility. *Nature Reviews Genetics*, 8: 253-62.
- RASSOULZADEGAN, M., GRANDJEAN, V., GOUNON, P., VINCENT, S., GILLOT, I., CUZIN, F. (2006), RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature*, 441(7092): 469-74.
- RAVELLI, A.C.J., VAN DER MEULEN, J.H.P., MICHELS, R.P.J., OSMOND, C., BARKER, D.J.P., HALES, C.N., BLEKER, O.P. (1998), Glucose tolerance in adults after exposure to the Dutch famine. *Lancet*, 351: 173-77.
- REHAN, V.K., LIU, J., SAKURAI, R., TORDAY, J.S. (2013), Perinatal nicotine-induced transgenerational asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 305(7):L501-L507. doi: 10.1152/ajplung.00078.2013

- REIK, W. (2007), Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 447: 425-32.
- REINHART, B.J., SLACK, F.J., BASSON, M., PASQUINELLI, A.E., BETTINGER, J.C., ROUGVIE, A.E., HORVITZ, H.R., RUVKUN, G. (2000), The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403: 901-6.
- REUSENS, B., REMACLE, C. (2009), *Programming of impaired insulin secretion versus sensitivity: cause or effect?* In: KOLETZKO, B., DECSI, T., MOLNAR, D., de LA HUNTRY, A. eds. *Early Nutrition Programming and Health Outcomes in Later Life: Obesity and Beyond*. pp. 125-31. Springer, Netherlands, Dordrecht, 2009.
- RICH-EDWARDS, J., COLDITZ, G., STAMPFER, M., WILLETT, W., GILLMAN, M., HENNEKENS, C. (1996), Birthweight and the risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in adult women. *Am J Epidemiol*, 143: S39.
- RICH-EDWARDS, J., COLDITZ, G., STAMPFER, M., WILLETT, W., GILLMAN, M., HENNEKENS, C.H., SPEIZER, F.E., MANSON, J.E. (1999), Birthweight and the risk for type 2 diabetes mellitus in adult women. *Ann Int Med*, 130: 278-84.
- RICH-EDWARDS, J., GILLMAN, M. (1997). Commentary: a hypothesis challenged. *BMJ*, 315(7119): 1348-9.
- RICH-EDWARDS, J., STAMPFER, M., MANSON, J.A.E., ROSNER, B., HANKINSON, S.E., COLDITZ, G. (1997), Birthweight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *BMJ*, 315: 396-400.
- RIGGS, A., XIONG, Z., WANG, L. (1998), *Methylation dynamics, epigenetic fidelity and X chromosome structure*. In: WOLFFE, A. (ed) *Epigenetics*. John Wiley and Sons, Chichester, pp. 214-27.
- RIGGS, A.D. (1975), X inactivation, differentiation and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet*, 14: 9-25.
- RISSMAN, E.F., ADLI, M. (2014), Minireview: transgenerational epigenetic inheritance: focus on endocrine disrupting compounds. *Endocrinology*, 155(8): 2770-80.
- RITOSSA, E. (1962), A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18: 571-3.
- RODGERS, A.B., MORGAN, C.P., BRONSON, S.L., REVELLO, S., BALE, T.L. (2013), Paternal stress exposure alters sperm microRNA content and reprograms offspring HPA stress axis regulation. *Journal of Neuroscience*, 33(21): 9003-12.

- RODRIGUEZ, A., BOHLIN, G. (2005), Are maternal smoking and stress during pregnancy related to ADHD symptoms in children? *J Child Psychol Psychiatry*, 46(3): 246-54.
- ROLLAND-CACHERA, M.F., DEHEEGER, M., GUILLOUD-BATAILLE, M., AVONS, P., GILLMAN, M.W., HENNEKENS, C.H., SPEIZER, F.E., MANSON, J.E. (1987), Tracking the development of adiposity from one month of age to adulthood. *Ann Hum Biol*, 14: 219-29.
- RONNENBERG, A.G., WANG, X., XING, H. (2003), Low preconception body mass index is associated with birth outcome in a prospective cohort of Chinese women. *J Nutr*, 133: 3449-55.
- ROSEBOOM, T.J., VAN DER MEULEN, J.H., OSMOND, C., BARKER, D.J., RAVELLI, A.C., BLEKER, O.P. (2000), Plasma lipid profiles in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *Am J Clin Nutr*, 72: 1101-6.
- ROSEBOOM, T.J., VAN DER MEULEN, J.H., OSMOND, C., BARKER, D.J., RAVELLI, A.C., SCHROEDER-TANKA, J.M., VAN MONTFRANS, G.A., MICHELS, R.P., BLEKER, O.P. (2000), Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine, 1944-45. *Heart*, 84: 595-8.
- ROSEBOOM, T.J., VAN DER MEULEN, J.H., RAVELLI, A.C., OSMOND, C., BARKER, D.J., BLEKER, O.P. (2001), Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Mol Cell Endocrinol*, 185: 93-8.
- ROSEBOOM, T.J., VAN DER MEULEN, J.H., RAVELLI, A.C., OSMOND, C., BARKER, D.J., BLEKER, O.P. (2003), Perceived health of adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 17: 391-7.
- RUDEN, D.M., JAMISON, C., ZEEBERG, B.R., GARFINKEL, M.D., WEINSTEIN, J.N., RASOULI, P., LU, X. (2008), The EDGE Hypothesis: Epigenetically Directed Genetic Errors in Repeat-Containing Proteins (RCPs) Involved in Evolution. *Neuroendocrine Signaling and Cancer Front Neuroendocrinology*, 29(3): 428-44.
- RUDEN, D.M., LU, X. (2008), Hsp90 affecting chromatin remodeling might explain transgenerational epigenetic inheritance in *Drosophila*. *Curr Genomics*, 9(7): 500-8. doi: 10.2174/138920208786241207.
- RUSSEL, P.J. (2007), *iGenetica*. II ed., EdiSES, Napoli (trad. it. di *iGenetics. A molecular approach*. Pearson Education Inc. 2006).
- RUTHERFORD, S.L., LINDQUIST, S. (1998), Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 396: 336-42.

- SANCHEZ-MUT, J.V., ALSO, E., HEYN, H., MATSUDA, T., BOCK, C., FERRER, I., ESTELLER M. (2014), Promoter hypermethylation of the phosphatase DUSP22 mediates PKA-dependent TAU Phosphorylation and CREB activation in Alzheimer's disease. *Hippocampus*, 24(4): 363-8. doi: 10.1002/hipo.22245
- SANDERSON, M., WILLIAMS, M.A., MALONE, K.E., STANFORD, J.L., EMANUEL, I., WHITE, E. (1996), Perinatal factors, and risk of breast cancer. *Epidemiology*, 7: 34-7.
- SANTOS, F., PETERS, A.H., OTTE, A.P., REIK, W., DEAN, W. (2005), Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Dev Biol*, 280: 225-36.
- SASAKI, A., DE VEGA, W.C., ST-CYR, S., PAN, P., MCGOWAN, P.O. (2013), Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood. *Neuroscience*, 240: 1-12.
- SCHIEVE, L.A., MEIKLE, S.F., FERRE, C., PETERSON, H.B., WILCOX, J.G. (2002), Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *The New England Journal of Medicine*, 346: 731-7.
- SCHMITT, A., MALCHOW, B., HASAN, A., FALKAI, P. (2014), The impact of environmental factors in severe psychiatric disorders. *Front Neurosci*, 8: 19.
- SCHULZ, L.C. (2010), The Dutch Hunger Winter and the development origins of health and disease. *PNAS*, 107: 16757-8.
- SELMİ, C., BRUNETTA, E., RAIMONDO, M.G., MERONI, P.L. (2012), The X chromosome and the sex ratio of autoimmunity. *Autoimmunity Review*, 11(6-7):A531-A537.
- SELYE, H. (1936), A syndrome produced by diverse noxious agents. *Journal of Neuropsychiatry Clinical Neurosciences*, 1998, 10(2): 230-1.
- SELYE, H. (1956), Endocrine reactions during stress. *Curr Res Anesth Analg*, 35(3): 182-93.
- SETOYAMA, T., LING, H., NATSUGOE, S., CALIN, G.A. (2011), Non-coding RNA for medical practice in oncology. *Keio J Med*, 60(4): 106-13.
- SHIIO, Y., EISENMAN, R.N. (2003), Histone acetylation is associated with transcriptional repression. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 100: 13225-30.
- SHIRE, J.G. (1976), The forms, uses and significance of genetic variation in endocrine systems. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 51: 105-141.

- SINCLAIR, K.D., ALLEGRUCCI, C., SINGH, R. (2007), DNA methylation, insuline resistance and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 19351-6.
- SKINNER, M.K. (2014), Endocrine disruptor induction of epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Mol Cell Endocrinol*, 398(1-2): 4-12.
- SKINNER, M.K., MANIKKAM, M., TRACEY, R., GUERRERO-BOSAGNA, C., HAQUE, M., NILSSON, E.E. (2013), Ancestral dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) exposure promotes epigenetic transgenerational inheritance of obesity. *BMC Med*, 11(1): 228.
- SLOBODA, D.M., HART, R., DOHERTY, D.A., PENNELL, C.E., HICKEY, M. (2007), Age at menarche: influences of prenatal and postnatal growth. *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 46-50.
- SOBEL, R.E., COOK, R.G., PERRY, C.A., ANNUNZIATO, A.T., ALLIS, C.D. (1995), Conservation of deposition-related acetylation sites in newly synthesized histones H3 and H4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 1237-41.
- SOMINSKY, L., FULLER, E.A., BONDARENKO, E., ONG, L.K., AVERELL, L., NALIVAICO, E. (2013), Functional programming of the autonomic nervous system by early life immune exposure: implications for anxiety. *PLoS One*, 8(3): e57700.
- SOOKOIAN, S., GIANOTTI, T.F., BURGUENO, A.L., PIROLA, C.J. (2013), Fetal metabolic programming and epigenetic modifications: a system biology approach. *Pediatr Res*, 73(4 Pt 2): 531-42. doi: 10.1038/pr.2013.2
- SPARÉN, P., VÅGERÖ, D., SHESTOV, D.B., PLAVINSKAJA, S., PARFENOVA, N., HOPTIAR, V., PATUROT, D., GALANTI, M.R. (2004), Long term mortality after severe starvation during the siege of Leningrad: prospective cohort study. *BMJ*, 328(7430): 11. doi: 10.1136/bmj.37942.603970.9A
- SPAUWEN, J., KRABBENDAM, L., LIEB, R., WITTCHEN, H.U., VAN OS, J. (2004), Early maternal stress and health behaviors and offspring expression of psychosis in adolescence. *Acta Psychiatr Scand*, 110(5): 356-64.
- STANNER, S.A., BULMER, K., ANDRÈS, C., LANTSEVA, O.E., BORODINA, V., POTEEN, V.V., YUDKIN, J.S. (1997), Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? Results from the Leningrad siege study, a cross sectional study. *BMJ*, 315(7119): 1342-8.
- STEIN, A.D., KAHN, H.S., RUNDLE, A., ZYBERT, P.A., VAN DER PAL-DE BRUIN, K., LUMEY, L.H. (2007), Anthropometric measures in middle age after exposure to famine during gestation: evidence from Dutch famine. *Am J Clin Nutr*, 85(3): 869-76.

- STEIN, A.D., SUSSER, M., SAENGLER, G., MAROLLA, F. (1975), *Famine and human development. The Dutch hunger winter of 1944-1945*. London, Oxford University Press, 1975.
- STEIN, A.D., ZYBERT, P.A., VAN DER PAL-DE BRUIN, K., LUMEY, L.H. (2006), Exposure to famine during gestation, size at birth and blood pressure at age 59 y: evidence from the Dutch famine. *Eur J Epidemiol*, 21: 759-65.
- STEIN, C.E., FALL, C.H.D., KUMARAN, K., OSMOND, C., COX, V., BARKER, D.J.P. (1996), Fetal growth and coronary heart disease in South India. *Lancet*, 348: 1269-73.
- STEL, J., LEGLER, J. (2015), The Role of Epigenetics in the Latent Effects of Early Life Exposure to Obesogenic Endocrine Disrupting Chemicals. *Endocrinology*, 156(10): 3466-72.
- ST-PIERRE, J., HIVERT, M.F., PERROM, P., POIRIER, P., GUAY, S.P., BRISSON, D., BOUCHARD, L. (2012), IGF-2 DNA methylation is a modulator of newborn's fetal growth and development. *Epigenetics*, 7(10): 1125-32.
- STRAKOVSKY, R.S., LEZMI, S., FLAWS, J.A., SCHANTZ, S.L., PAN, Y.X., HELFERICH, W.G. (2013), Genistein exposure during the early postnatal period favors the development of obesity in female, but not male rats. *Toxicol Sci*, kft331.
- STRAKOVSKY, R.S., WANG, H., ENGESETH, N.J. (2015), Developmental bisphenol A (BPA) exposure leads to sex-specific modification of hepatic gene expression and epigenome at birth that may exacerbate high-fat diet-induced hepatic steatosis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 284(2): 101-12.
- SUN, Y.E., WU, H. (2006), The ups and down of BDNF in Rett syndrome. *Neuron*, 49(3): 321-3.
- SURANI, M.A., BARTON, S.C., NORRIS, M.L. (1984), Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*, 308: 548-50.
- SUSSER, E., LIN, S.P., BROWN, A.S., LUMEY, L.H., ERLLENMEYER-KIMLING, L. (1994), No relation between risk of schizophrenia and prenatal exposure to influenza in Holland. *Am J Psychiatry*, 151(6): 922-4.
- SUSSER, E., NEUGEBAUER, R., HOEK, H.W., BROWN, A.S., LIN, S., LABOVITZ, D. (1996), Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence. *Arch Gen Psychiatry*, 53(1): 25-31.
- SUSSER, E., ST-CLAIR, D., HE, L. (2008), Latent effects of prenatal malnutrition on adult health: the example of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci*, 1136: 185-92.

- SUTHERLAND, J.E., COSTA, M. (2003), Epigenetics and the environment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 983: 151-60.
- SUTTER, N.B., OSTRANDER, E.A. (2004), Dog star rising: the canine genetic system. *Nature Reviews Genetics*, 5: 900-10.
- SUZUKI, M.M., BIRD, A. (2008), DNA methylation landscapes; provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics*, 10: 295-304.
- SWEATT, J.D., MEANEY, M.J., NESTLER, E.J., AKBARIAN S. (2009). *Epigenetic regulation in the nervous system*. Academic Press, Elsevier, Amsterdam.
- SZYF, M., WEAVER, I., MEANEY, M. (2007), Maternal care, the epigenome and phenotypic differences in behavior. *Reprod. Toxicol.*, 24: 9-19.
- SZYF, M., MCGOWAN, P., MEANEY, M. (2008), The social environment and epigenome. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49: 46-60.
- TAMASHIRO, K.L., MORAN, T.H. (2010), Perinatal environment and its influences on metabolic programming of offspring. *Physiol Behav*, 100(5): 560-6.
- TAMASHIRO, K.L., TERRILLION, C.E., HYUN, J., KOENIG, J.I., MORAN, T.H. (2009), Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes*, 58(5): 1116-25.
- TEMIN, H.M., MIZUTANI, S. (1970), RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226(5252):1211-3.
- TEMPLE, I.K., SHIELD, J.P. (2002), Transient neonatal diabetes, a disorder of imprinting. *Journal of Medical Genetic*, 39: 872-5.
- TOBI, E.W., LUMEY, L.H., TALENS, R.P. (2009), DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum Mol Genet*, 18: 4046-53.
- TOLLEFSBOL, T. (2011), *Handbook of epigenetics. The new molecular and medical genetics*. Academic Press, San Diego.
- TORRENS, C., HANSON, M.A., GLUCKMAN, P.D., VICKERS, M.H. (2009), Maternal undernutrition leads to endothelial dysfunction in adult male rat offspring independent of postnatal diet. *British Journal of Nutrition*, 101: 27-33.
- TREMOLIZZO, L., CARBONI, G., RUZICKA, W.B., MITCHELL, C.P., SUGAYA, I., TUETING, P., SHARMA, R., GRAYSON, D.R., COSTA, E., GUIDOTTI, A. (2002), An

- epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 99: 17095-100.
- TRUT, L.N. (1989), Early canid domestication: the farm fox experiment. *American Scientist*, 87: 160-5.
- TRUT, L.N., PLIUSNINA, I.Z., OS'KINA, I.N. (2004), An experiment on fox domestication and debatable issues of evolution of the dog. *Genetika*, 40: 794-807.
- TSANKOVA, N.M., BERTON, O., RENTHAL, W., NEVE, R.L., NESTLER, E.J. (2006), Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci*, 9(4): 519-25.
- TURNER, B.M. (2000), Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*, 22: 836-45.
- VALDEZ, R., ATHENS, M.A., THOMPSON, G.H., BRADSHAW, B.S., STERN, M.P. (1994), Birthweight and adult health outcomes in a biethnic population in the USA. *Diabetologia*, 37: 624-31.
- VAN DEN BERG, I.M. (2009), X chromosome inactivation is initiated in human preimplantation embryos. *The American Journal of Human Genetics*, 84: 771-9.
- VAN DER HORST, A., TERTOOLEN, L.G., DE VRIES-SMITS, L.M., FRYE, R.A., MEDEMA, R.H. (2004), *FOXO4* is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2 (*SIRT1*). *Journal of Biological Chemistry*, 279: 28873-9.
- VAN DER KROL, R., MUR, L.A., BELD, M., MOL, J.N., STUITJE, A.R. (1990), Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*, 2: 291-9.
- VELDIC, M., GUIDOTTI, A., MALOKU, E., DAVIS, J.M., COSTA, E. (2005), In psychosis, cortical interneurons overexpress DNA-methyltransferase-1. *Psychopharmacology*, 180(2): 191-205.
- VICKERS, M.H., GLUCKMAN, P.D., COVENY, A.H. (2005), Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology*, 146: 4211-6.
- WADDINGTON, C.H. (1939). Preliminary Notes on the Development of the Wings in Normal and Mutant Strains of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 25(7): 299-307.
- WADDINGTON, C.H. (1942), Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, 150: 563-5.
- WADDINGTON, C.H. (1942), The Epigenotype. *Endeavour*, 18-20.



- WADDINGTON, C.H. (1957), *The Strategy of Genes: A Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology*. George Allen & Unwin, London, 262.
- WADDINGTON, C.H. (1961), *The Nature of Life*. Atheneum, New York.
- WADDINGTON, C.H. (1979), *L'evoluzione di un evoluzionista*. A cura di F. Voltaggio, Armando, Roma.
- WAHLBECK, K., FORSÉN, T., OSMOND, C., BARKER, D.J.P., ERIKSSON, J.G. (2001), Association of schizophrenia with low maternal body mass index, small size at birth and thinness during childhood. *Arch Gen Psych*, 58:48-52.
- WALKER, A.K., NAKAMURA, T., BYRNE, R.J., NAICKER, S., TYNAN, R.J., HUNTER, M. (2009), Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behavior and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis. *Psychoneuroendocrinology*, 34(10): 1515-25.
- WALKER, A.K., NAKAMURA, T., HODGSON, D.M. (2010), Neonatal lipopolysaccharide exposure alters central cytokine responses to stress in adulthood in Wistar rats. *Stress*, 13(6): 506-15.
- WANG, H., DUCLOT, F., LIU, Y., WANG, Z., KABBAJ, M. (2013), Histone deacetylase inhibitors facilitate partner preference formation in female prairie voles. *Nat Neurosci*, 16(7): 919-24. doi: 10.1038/nn.3420
- WATERLAND, R.A., MICHELS, B.B. (2007), Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annual Reviews of Nutrition*, 27: 363-88.
- WATSON, J.D., CRICK, F.H. (1953), A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171: 737-8. doi: 10. 1038/171737a0.
- WEISMANN, A. (1893), *Über die Vererbung*. Jena, Germany: Gustav Fisher.
- WIDDOWSON, E.M., McCANCE, R.A. (1974), The determinants of growth and form. *Proc R Soc Lond*, 185: 1-17.
- WIDDOWSON, E.M., McCANCE, R.A. (1975), A review: new thoughts on growth. *Pediatr Res*, 9: 154-6.
- WOCHNIK, G.M., RUEGG, J., ABEL, G.A., SCHMIDT, U., HOLSBOER, F., REIN, T. (2005), FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 4609-16.

- WOOD, J.G., ROGINA, B., LAVU, S., HOWITZ, K., HELFAND, S.L. (2004), Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, 430: 686-9.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2012). *State of the science of endocrine disrupting chemicals*. Disponibile da: <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2014). *Global status report on noncommunicable disease*. Disponibile da: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>.
- WU, Q., SUZUKI, M. (2006), Parental obesity and overweight affect the body-fat accumulation in the offspring: the possible effect of a high-fat diet through epigenetic inheritance. *Obesity Review*, 7: 201-8.
- WYATT, G.R. (1950), Occurrence of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Nature*, 166: 237-8.
- WYATT, G.R. (1951a), Recognition and estimation of 5-methylcytosine in nucleic acids, *Biochemical Journal*, 48: 581-4.
- WYATT, G.R. (1951b), The purine and pyrimidine composition of deoxypentose nucleic acids. *Biochemical Journal*, 48: 584-90.
- YAJNIK, C.S., FALL, C.H.D., VAIDYA, U., PANDIT, A.N., BAVDEKAR, A., BHAT, D.S. (1995), Fetal growth and glucose and insulin metabolism in four-year-old Indian children. *Diabet Med*, 12: 330-6.
- YAN, Z., ZHANG, H., MAHER, C. (2014), Prenatal polycyclic aromatic hydrocarbon, adiposity, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma methylation in offspring, grand-offspring mice. *PLoS One*, 9(10): e110706.
- YEHUDA, R., CAI, G., GOLIER, J.A., SARAPAS, C., GALEA, S., ISING, M. (2009), Gene expression patterns associated with post-traumatic stress disorder following exposure to the World Trade Center attacks. *Biol Psychiatry*, 66:708-11.
- YEHUDA, R., DASKALAKIS, N.P., BIERER, L.M., BADER, H.N., KLENGEL, T., HOLLSBOER, F., BINDER, E.B. (2015), Holocaust exposure induced intergenerational effects on FKBP5 methylation. *Biol Psychiatry*, pii: S0006-3223(15)00652-6. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.08.005
- YING, A.K., HASSANAIN, H.H., ROOS, C.M. (2000), Methylation of the estrogen receptor-alpha gene promoter is selectively increased in proliferating human aortic smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*, 46: 172-9.
- ZAINA, S., LINDHOLM, M.W., LUND, G. (2005), Nutrition and aberrant DNA methylation patterns in atherosclerosis: more than just hyperhomocysteinemia? *The Journal of Nutrition Health and Aging*, 135: 5-8.

- ZHANG, T.Y., LABONTE', B., WEN, X.L., TURECKI, G., MEANEY, M.J. (2013a), Epigenetic Mechanisms for the Early Environmental Regulation of Hippocampal glucocorticoid Receptor Gene Expression in Rodents and Humans. *Neuropsychopharmacology Reviews*, 38: 111-23.
- ZHAO, R., AVEY, M., HSU, Y.C., KAPLANEK, P., TONG, A., PARSONS, A.B., KROGAN, N., CAGNEY, G., MAI, D., GREENBLATT, J., BOONE, C., EMILI, A., HOURY, W.A. (2005), Navigating the chaperone network an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the Hsp90 chaperone. *Cell*, 120(5): 715-27.
- ZORNBERG, G.L., BUKA, S.L., TSUANG, M.T. (2000), Hypoxic-ischemia-related fetal/neonatal complications and risk of schizophrenia and other non-affective psychoses: a 19-year longitudinal study. *Am J Psychiatry*, 157(2): 196-202.
- ZORNBERG, G.L., BUKA, S.L., TSUANG, M.T. (2000), The problem of obstetrical complications and schizophrenia. *Schizophr Bull*, 26(2): 249-56.